

**Der Einfluss der lokalen oder systemischen
Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Inhibition auf die
Immunantwort im Modell der experimentellen
autoimmunen Uveoretinitis**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Martin Busch
aus Leverkusen

Juni 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Ophtha-Lab der Augenärzte am St. Franziskus Hospital, der zentralen tierexperimentellen Einrichtung und der Hautklinik des Universitätsklinikums in Münster sowie im histologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums in Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Arnd Heiligenhaus

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Brandau

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. rer. nat. Hynek Burda

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2012

1. Einleitung	7
1.1 Die angeborene und adaptive Immunantwort	7
1.2 Mechanismen der immunologischen Toleranz	10
1.3 Das Immunprivileg des Auges	13
1.4 Uveoretinitis	15
1.5 Experimentelle autoimmune Uveoretinitis (EAU)	20
1.6 Das Zielmolekül Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)	26
1.7 Die TNF- α inhibierenden Wirkstoffe	31
1.7.1 Etanercept	31
1.7.2 Antisense-Oligonukleotide (ASON)	32
1.8 Zielsetzung der Arbeit	35
2. Material und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Chemikalien	37
2.1.2 Antikörper und Biochemikalien	39
2.1.2.1 Primärantikörper	39
2.1.2.2 Sekundärantikörper	39
2.1.2.3 Biochemikalien	39
2.1.3 Wirkstoffe und Arzneimittel	40
2.1.4 Seren	40
2.1.5 Kits	40
2.1.6 Verbrauchsmaterial	41
2.1.7 Sonstiges Material	42
2.1.8 Geräte	42
2.1.9 Puffer und Lösungen	43
2.1.9.1 Puffer und Lösungen für Injektionszwecke	43
2.1.9.2 Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie	43
2.1.9.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur	44
2.1.9.4 Puffer und Lösungen für den Enzym-gekoppelten Immunadsorbtionstest	45
2.1.9.5 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	45
2.1.9.6. Puffer und Lösungen für den Western Blot	45
2.2 Methoden	47
2.2.1 TNF- α -Bioassay	47
2.2.2 Versuchstiere	48
2.2.3 Behandlungen der Versuchstiere	48
2.2.3.1 EAU-Induktion durch aktive Immunisierung	48

2.2.3.2 Narkose der Versuchstiere	49
2.2.3.3 Systemische Applikation von Etanercept	49
2.2.3.4 Subkonjunktivale Applikation von Etanercept	50
2.2.3.5 Intravitreale Wirkstoffapplikation mit einer Glaskapillare	50
2.2.3.6 Intravitreale Wirkstoffapplikation mit einer Mikroliterspritze	50
2.2.3.7 Intravitreale Applikation von Etanercept	51
2.2.3.8 Lokale Applikation von Antisense-Oligonukleotiden (ASON)	51
2.2.4 <i>In vivo</i> Untersuchung des Augenhintergrundes	52
2.2.5 Töten der Versuchstiere	52
2.2.6 Organentnahme	52
2.2.6.1 Entnahme der Augen	52
2.2.6.2 Entnahme von Milzen und Lymphknoten	53
2.2.7 Histologische Beurteilung des EAU-Schweregrades	53
2.2.7.1 Erstellung histologischer Gewebeschnitte von Mäusaugen	53
2.2.7.2 Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte	54
2.2.7.3 Bestimmung des EAU-Schweregrades	55
2.2.8 Kultivierung von Zellen aus der Milz und den regionalen Lymphknoten	56
2.2.8.1 Erstellung von Einzelzellsuspensionen	56
2.2.8.2 Bestimmung der Zellzahl mit einer Zählkammer nach Neubauer	57
2.2.8.3 Aussaat und Inkubation der Zellen	57
2.2.9 Proliferationsassay	58
2.2.10 Bestimmung des Zytokingehaltes in Zellkulturüberständen	58
2.2.11 EAU-Induktion durch adoptiven Transfer	60
2.2.12 Induktion einer Glaskörperraum-assoziierten Immundeviation	61
2.2.13 Induktion einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (DTH)	62
2.2.14 Aufnahme FITC-markierter Kontrolloligonukleotide nach lokaler Applikation	62
2.2.14.1 Fluoreszenzmikroskopie von Gewebeschnitten der Augen	63
2.2.14.2 Immunfluoreszenz-Färbung von saurem Gliafaserprotein	63
2.2.14.3 Durchflusszytometrie	65
2.2.14.3.1 Allgemeine Prinzipien der Durchflusszytometrie und Funktion des Durchflusszytometers	65
2.2.14.3.2 Untersuchung von Einzelzellsuspensionen der Milz und der regionalen Lymphknoten nach lokaler Applikation FITC-markierter KON mit dem Durchflusszytometer	67
2.2.15 Durchflusszytometrische Analyse von intrazellulärem TNF- α in Einzelzellsuspensionen der Milz nach Etanercept-Behandlung	68
2.2.16 Bestimmung des Zytokingehaltes in den okulären Geweben	71
2.2.16.1 Präparation der Augen	71

2.2.16.2 Quantifizierung der Zytokine	72
2.2.17 Immunhistochemische Detektion von TNF- α auf Gewebeschnitten von Augen	73
2.2.18 <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Hemmung der TNF- α -Expression durch ASON an Knochenmarkmakrophagen	74
2.2.18.1 Gewinnung von Knochenmarkmakrophagen	74
2.2.18.2 Stimulation der Knochenmarkmakrophagen	75
2.2.18.3 Proteinisolation aus Knochenmarkmakrophagen	75
2.2.18.4 Western Blot	75
2.2.19 Statistische Datenauswertung	77
3. Ergebnisse	78
3.1 Allgemeine Ergebnisse zur Auslösung des EAU-Modells und der intravitrealen Injektionen	78
3.1.1 Auslösung des EAU-Modells	78
3.1.2 Etablierung der intravitrealen Injektionen	81
3.2 Proliferation von isolierten Zellen aus der Milz und den submandibulären Lymphknoten aktiv immunisierter Mäuse	82
3.3 <i>In vitro</i> Experimente zur Blockade von murinem TNF- α durch Etanercept	85
3.4 Systemische Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU	87
3.4.1 Histopathologische Beurteilung des Entzündungsgrades	87
3.4.2 Proliferationstest von Milzzellen	88
3.4.3 Zytokingehalt von Zellkulturüberständen der Milz	89
3.4.4 <i>In vivo</i> Zytokingehalt vollständiger Augen	91
3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur systemischen Etanercept-Applikation in der afferenten Phase der EAU	92
3.5 Lokale Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU	92
3.5.1 Intravitreale Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU	92
3.5.2 Subkonjunktivale Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU	97
3.6 Systemische und lokale Behandlung mit Etanercept in der efferenten Phase der EAU	97
3.7 Systemische Behandlung mit Etanercept bei EAU-Induktion durch adoptiven Transfer	98
3.8 Einfluss von Etanercept auf die Induktion von VCAID	100
3.9 Lokale Applikation von ASON	102
3.9.1 <i>In vitro</i> TNF- α -Inhibition durch ASON	102
3.9.2 Aufnahme FITC-markierter Kontrolloligonukleotide nach lokaler Applikation	104

3.9.3 Effekt der lokalen Applikation von ASON auf die EAU	106
3.10 Die Detektion des Zielmoleküls TNF- α	108
4. Diskussion	111
4.1 Effekte der systemischen Etanercept-Applikation in der afferenten und der efferenten Phase	111
4.2 Effekte der intraokulären TNF- α -Inhibition durch Etanercept	116
4.3 Reduktion des EAU-Schweregrades im kontralateralen Auge	119
4.4 Unterschiedliche Wirkmechanismen von systemisch und intravitreal appliziertem Etanercept	121
4.5 Regulatorische Funktionen von TNF- α im Auge	123
4.6 Die lokale Applikation von ASON bei EAU	124
4.7 Schlussfolgerung	126
4.8 Ausblick	127
5. Zusammenfassung	131
6. Summary	133
7. Literaturverzeichnis	135
8. Abkürzungsverzeichnis	162
9. Publikationsliste	165
9.1 Artikel	165
9.2 Vorträge	165
9.3 Poster	165
Anhang	168

1. Einleitung

1.1 Die angeborene und adaptive Immunantwort

Die angeborene Immunantwort ist eine rasch einsetzende Reaktion primär auf eingedrungene Krankheitserreger und dient der frühzeitigen Bekämpfung und Verhinderung der systemischen Ausbreitung von Pathogenen. Als phylogenetisch älteres System ist sie eine unspezifische Immunreaktion, in deren Zuge Pathogene durch Leukozyten phagozytiert und zerstört werden. Diese Leukozyten umfassen Monozyten bzw. Makrophagen, dendritische Zellen sowie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (Streilein 1999). Die Erkennung von Pathogenen durch Zellen der angeborenen Immunität erfolgt durch die Wechselwirkung von Strukturen, die typischerweise auf der Oberfläche von Pathogenen vorkommen, den sogenannten PAMPs (engl. pathogen-associated molecular patterns), mit Mustererkennungsrezeptoren (PRR; engl. pattern recognition receptors) des angeborenen Immunsystems. Zu solchen Mustererkennungsrezeptoren, die pathogen assoziierte molekulare Muster binden, zählen beispielsweise Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR; engl. Toll like receptor), C-Typ Lektin Rezeptoren oder Scavenger Rezeptoren (Hampton et al. 1991; Dunne et al. 1994; Kopp & Medzhitov 1999; McGreal et al. 2005; Bianchi 2007). Ausschließlich konserviert auf verschiedenen Mikroorganismen vorkommende molekulare Struktur motive sind beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) als Zellbestandteil gram-negativer Bakterien, Teichoinsäure als Zellwandbestandteil gram-positiver Bakterien, Peptidoglykan, Mannane als Zellwandbestandteil von Hefen oder doppelsträngige RNA als Strukturmerkmal bestimmter Viren. Diese Strukturmuster zeichnet aus, dass sie natürlicherweise nicht im Wirtsorganismus auftreten, aber für den entsprechenden Krankheitserreger essentiell sind (Medzhitov & Janeway 1997; Hampton et al. 1991; Dunne et al. 1994).

Die Bindung von PAMPs an PRRs aktiviert die entsprechenden Zellen, die daraufhin ihre Effektorfunktionen generieren. Die Ligation von PRRs neutrophiler Granulozyten führt zu der Phagozytose der entsprechenden Pathogene. Darüber hinaus produzieren aktivierte neutrophile Granulozyten reaktive Sauerstoffverbindungen und setzen lytische Granula frei, die die eingedrungenen Krankheitserreger zerstören. Auch Makrophagen haben eine erhöhte Phagozytoseaktivität in Reaktion auf die Bindung von PAMPs (Pearson 1996; Streilein 1999; Kaplan & Niederkorn 2007). Desweiteren führt die Signaltransduktion nach PRR-Ligation zur Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen und damit zur Induktion von Transkriptionsfaktoren wie NF κ -B (engl. nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells). Dies wiederum induziert die Produktion von Zytokinen, die weitere immunmodulatorische und aktivierende Effekte aufweisen (Kopp & Medzhitov 1999;

Brightbill et al. 1999; Akira & Takeda 2004). So produzieren aktivierte Makrophagen antimikrobielle Produkte wie beispielsweise Stickoxid-Verbindungen (Brightbill et al. 1999; Thoma-Uszynski et al. 2001), die neben verschiedenen anderen Mediatoren und Mechanismen am Ort der Infektion zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes als typische Begleiterscheinung einer solchen Entzündungsreaktion führen kann. Die Schädigung und Zerstörung von Gewebe und Zellen wiederum führt zu der Freisetzung endogener Substanzen, sogenannten Alarminen, die teilweise über gleiche Rezeptoren wie PAMPs die Aktivierung von Effektorfunktionen des angeborenen Immunsystems vermitteln können (Bianchi 2007).

Weitere Bestandteile der angeborenen Immunität bilden Plasmaproteine des Komplementsystems. Das Komplementsystem beinhaltet Proteinaktivierungskaskaden, die zu einer Opsonisierung der Oberfläche von Bakterien mit Komplementproteinen führt. Diese Opsonisierung erleichtert zum einen die Aufnahme von Pathogenen durch Phagozyten. Zum anderen können bestimmte Faktoren des Komplementsystems eine Pore in der Zellwand von Bakterien bilden und so deren Lyse verursachen (Rambach et al. 2008).

Die adaptive Immunantwort wird durch T-Lymphozyten und B-Lymphozyten vermittelt und ist spezifisch gegen bestimmte Antigene gerichtet. Der Begriff Antigen steht für „Antikörper generierend“. Damit sind Antigene Moleküle, die die Bildung spezifischer Antikörper, die das entsprechende Antigen binden, induzieren (Janeway et al. 2002). Antikörper werden von Plasmazellen gebildet, die aus B-Lymphozyten hervorgehen. Der Körper verfügt über ein großes Repertoire an B-Zellen, die sich in ihrer Spezifität für verschiedene Antigene unterscheiden. Jede B-Zelle bildet nach der Differenzierung zu einer Plasmazelle einen bestimmten Antikörper, der spezifisch ein entsprechendes Antigen bindet. Auch T-Lymphozyten sind antigen-spezifisch. Jede T-Zelle exprimiert einen Oberflächenrezeptor (T-Zell-Rezeptor), der spezifisch ein bestimmtes Antigen binden kann. Durch die Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor wird die T-Zelle aktiviert. Die T-Zell-Aktivierung ist dabei nicht von der Antigen-Bindung allein abhängig, sondern es bedarf der zusätzlichen Beteiligung von Zellen und Faktoren des angeborenen Immunsystems (Heeger et al. 2005; Kaplan & Niederkorn 2007). Die angeborene und adaptive Immunantwort stellen daher keine getrennten oder isolierten Systeme dar. Vielmehr treten ihre Protagonisten miteinander in Interaktion. Makrophagen und dendritische Zellen sind wichtige professionelle Antigen präsentierende Zellen (APZ), die Antigene aufnehmen und prozessieren und den T-Lymphozyten auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC; engl. major histocompatibility complex) präsentieren (Jiang et al. 1995; Sallusto et al. 1995; Fearon &

Locksley 1996; Streilein 1999). Die durch den Kontakt mit PAMPs aktivierten bzw. gereiften APZ exprimieren kostimulierende Signale (Oberflächenmoleküle und Zytokine), die neben weiteren Faktoren des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise Komplementkomponenten entscheidend für die Aktivierung der Effektorfunktionen der T-Lymphozyten bzw. der adaptiven Immunantwort sind (Reiser et al. 1992; Lenschow et al. 1993; Bluestone 1995; Heeger et al. 2005; Joffre et al. 2009). Professionelle APZ migrieren nach der Aufnahme von Antigenen in peripheren Geweben zu den sekundären Lymphorganen, wo die Antigenpräsentation und Aktivierung der T-Zellen erfolgt (Steinman 1991). Daraufhin proliferieren diese und differenzieren ihre Effektorfunktionen aus. Entscheidende Kriterien für die Differenzierung sind das vorherrschende Zytokinmilieu sowie die Art der Antigenpräsentation (Fearon & Locksley 1996; Streilein 1999; Joffre et al. 2009; Zhu et al. 2010). CD8⁺ T-Lymphozyten erkennen Antigene, die auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden. Unter dem zusätzlichen Einfluss von Zytokinen wie Interleukin (IL)-2, IL-12, Interferon (IFN)- γ sowie IFN- α und - β wird die Expansion und Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen gefördert (Simon et al. 1986; Mehrotra et al. 1993; Curtsinger et al. 2003; Pham et al. 2011; Baumgartner & Malherbe 2011). Die Antigenpräsentation durch MHC Klasse II Moleküle auf der Oberfläche von professionellen APZ wie beispielsweise dendritischen Zellen und B-Zellen aktiviert CD4⁺ T-Lymphozyten (Crawford et al. 2006; Baumgartner & Malherbe 2011), die zu unterschiedlichen T-Helferzell-Subtypen differenzieren können. Diese Subtypen unterscheiden sich durch das ihrerseits sezernierte Zytokinprofil, das neben Zell-Zell-Kontakt abhängigen Signalen die Effektorfunktionen vermittelt (Mosmann et al. 1986; Cherwinski et al. 1987; Cher & Mosmann 1987; Killar et al. 1987; Bottomly 1988; Cresswell 1994; Zhu et al. 2010). Die aktivierten Lymphozyten werden über die Blutbahn zu dem Entzündungs- oder Infektionsherd transportiert. Durch die ausgeschütteten Zytokine nehmen die T-Helferzellen Einfluss auf Zellen des angeborenen Immunsystems und deren Effektorfunktionen, aber auch auf parenchymale Zellen verschiedener Gewebe, Endothelzellen und B-Zellen und vermitteln so eine Entzündungskaskade zur Eliminierung der körperfremden Antigene bzw. Pathogene. Dieser Pfad der adaptiven Immunität wird auch als zelluläre Immunität bezeichnet. Die humorale Immunität beschreibt als zweiten Pfad die Produktion spezifischer Antikörper durch B-Zellen nach deren Aktivierung in den sekundären Lymphorganen (Streilein 1999).

1.2 Mechanismen der immunologischen Toleranz

Die Immuntoleranz beschreibt die Unfähigkeit des Immunsystems, eine antigenspezifische Immunabwehr zu generieren. Dies ist beispielsweise bei der oralen Toleranz gegenüber Antigenen, die mit der Nahrung aufgenommen wurden, von Bedeutung. Werden Antigene aus der Nahrung im Darmlumen von der Darmschleimhaut aufgenommen, kommen sie in Kontakt mit dem Darmschleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT; gut associated lymphoid tissue). Das GALT weist eine bestimmte zelluläre Zusammensetzung des angeborenen und adaptiven Immunsystems auf. Dazu zählen Immunglobulin (Ig) A sezernierende B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und verschiedene T-Zell-Populationen (Streilein 1999; Thureau & Wildner 2002). In einer spezifischen Reaktion auf das aufgenommene Antigen werden Suppressorzellen aktiviert. Diese vermitteln über die Produktion eines bestimmten Zytokinmilieus die Unterdrückung von potentiell inflammatorischen, antigenspezifischen Effektorzellen (Thureau & Wildner 2002).

Wie bei der oralen Toleranz gegenüber Antigenen aus der Nahrung existieren Toleranzmechanismen des Immunsystems, die eine Immunabwehr von körpereigenen Antigenen und damit die Bekämpfung körpereigener Gewebe verhindern. Diesbezüglich wird zwischen zentralen und peripheren Toleranzmechanismen unterschieden. Bei den zentralen Toleranzmechanismen erfolgt die Toleranzinduktion in den zentralen Lymphorganen. Dazu zählen Knochenmark und Thymus.

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark, wo Stromazellen Wachstumsfaktoren und kontaktabhängige Signale zur Differenzierung liefern. Während der aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien kommt es zu einer Neuordnung und Verknüpfung der Gensegmente, die für den B-Zell-Rezeptor kodieren. Dadurch werden B-Zellen hervorgebracht, die auf ihrer Oberfläche jeweils Antigenrezeptoren in Form von Immunglobulin-Molekülen mit einzigartiger Spezifität tragen. Um die Produktion autoreaktiver Antikörper auszuschließen, werden B-Zellen, deren Rezeptor eine Spezifität für körpereigene Antigenstrukturen auf den Stromazellen aufweist, im Zuge der negativen Selektion im Knochenmark eliminiert. Durch das sogenannte Rezeptor-Editing kann die autoreaktive B-Zelle jedoch vor dem Zelltod bewahrt werden. Dabei entsteht durch weitere Genumlagerungen ein B-Zell-Rezeptor mit veränderter Spezifität. Für das Rezeptor-Editing oder eine Eliminierung der sich entwickelnden B-Zelle muss der B-Zell-Rezeptor durch das Autoantigen stark quervernetzt werden. Wird der B-Zell-Rezeptor z.B. durch lösliche Autoantigene nur wenig quervernetzt, wird Anergie der unreifen B-Zelle ausgelöst. Diese B-Zellen sterben nicht sofort, haben aber eine verkürzte Lebensdauer, da sie durch den Kontakt mit dem Autoantigen und auch Signale

von T-Helferzellen in der Peripherie nicht aktiviert werden können. B-Zellen, deren Rezeptor nicht mit Autoantigenen in Interaktion tritt oder nur mit geringer Affinität, verlassen das Knochenmark und gelangen in die peripheren Lymphorgane, wo sie sich letztlich zu reifen B-Zellen entwickeln (Miller & Basten 1996).

Auch T-Zellen bzw. deren Vorläuferzellen werden im Knochenmark gebildet, reifen allerdings anschließend im Thymus heran. Wenn die Vorläuferzellen den Thymus erreichen exprimieren sie weder einen T-Zell-Rezeptor noch die akzessorischen Oberflächenmoleküle CD4 und CD8. Wie die Entwicklung von B-Zellen auch ist die Abfolge der Entwicklungsstadien einer reifenden T-Zelle mit der Neuordnung von Gensegmenten verbunden, die für die Proteinketten des T-Zell-Rezeptors kodieren. Durch erfolgreiche Genumlagerungen entstehen T-Zellen, die jeweils einen einzigartigen Rezeptor aufweisen und im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung die akzessorischen Oberflächenmoleküle exprimieren (Ramsdell & Fowlkes 1990; Blackman et al. 1990; Labreque et al. 2011). T-Zellen, deren Rezeptor eine starke Affinität und Reaktivität für körpereigene Antigene aufweisen, werden während der Entwicklung im Thymus eliminiert. Dies erfolgt in wesentlichem Maße durch klonale Deletion bei der spezifischen Interaktion eines T-Zell-Rezeptors mit Komplexen aus Peptidantigenen und MHC-Molekülen auf der Oberfläche von Epithelzellen des Thymus und vor allem aus dem Knochenmark stammenden APZ im Zuge der negativen Selektion. Löst die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Autoantigen:MHC-Komplex ein starkes Signal aus, wird in der betreffenden unreifen T-Zelle der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert (Matzinger & Guerder 1989; Webb & Sprent 1990; Ramsdell & Fowlkes 1990; Blackman et al. 1990; Fowlkes & Ramsdell 1993; Ashton-Rickardt et al. 1994; Hogquist et al. 1994; Sprent & Webb 1995; Labreque et al. 2011). Allerdings werden nicht alle körpereigenen Proteine im Thymus exprimiert, sodass T-Zellen mit entsprechender Spezifität nicht eliminiert werden. Daher können auch reife, autoreaktive T-Zellen den Thymus verlassen. Diese T-Zellen können durch periphere Toleranzmechanismen kontrolliert werden.

Für die Aktivierung der Effektorfunktionen von T-Zellen, die in der Proliferation, Differenzierung und Zytokinproduktion der T-Zellen resultiert, sind neben der Interaktion mit dem Peptid:MHC-Komplex kostimulierende Signale von professionellen APZ erforderlich (Schwartz 1990; Wells 2009), die ihrerseits beispielsweise durch die Bindung von mikrobiellen Strukturmerkmalen an Mustererkennungsrezeptoren aktiviert wurden (Banchereau & Steinman 1998; Goerdts et al. 1999). Erfolgt die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid:MHC-Komplex einer APZ, die keine kostimulierenden Signale aussendet, wird in der T-Zelle ein Zustand ausgelöst, der als Anergie bezeichnet wird. Anergische T-Zellen

können auch zu einem späteren Zeitpunkt nicht durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden. Dieser Zustand inaktivierter Effektorfunktionen bzw. der Unempfindlichkeit kann für mehrere Wochen aufrecht erhalten werden. Mit diesem Mechanismus kann verhindert werden, dass potentiell autoreaktive T-Zellen, die sich den Mechanismen der klonalen Deletion im Thymus entzogen haben, eine Autoimmunreaktion gegen gewebespezifische körpereigene Antigene auslösen (Schwartz 1990; Wells 2009; Allen et al. 2011). Die funktionale Inaktivierung (Anergie) von T-Zellen kann auch bereits im Thymus erfolgen (Ramsdell & Fowlkes 1990). Auf der anderen Seite kann eine T-Zelle möglicherweise auch in der Peripherie deletiert werden, wenn sie in Kontakt mit dem Autoantigen bei Abwesenheit kostimulierender Signale einer APZ kommt. Demnach können sowohl bei unreifen als auch bei reifen T-Zellen die gleichen Arten der Toleranzinduktion in Form von klonaler Deletion oder Anergie greifen, wobei sich die Mechanismen und biochemischen Grundlagen jedoch unterscheiden können (Fowlkes & Ramsdell 1993). Wie bei der Toleranzinduktion im Thymus auch sind die Affinität des T-Zell-Rezeptors zu dem Autoantigen, der Grad der Expression des T-Zell-Rezeptors und akzessorischer Moleküle, die Natur der APZ bzw. des jeweiligen autoantigentragenden Gewebes sowie die Frequenz, Dauer und Intensität der Interaktion mit dem Autoantigen:MHC-Komplex entscheidende Parameter für den Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion (Arnold et al. 1993).

Die Mechanismen der klonalen Deletion und Anergie unterscheiden sich vom Mechanismus der immunologischen Ignoranz. Dabei kommen potentiell autoreaktive T-Zellen gar nicht mit dem Autoantigen in Kontakt, haben eine zu geringe Affinität für das Autoantigen oder das Autoantigen liegt in derart geringen Konzentrationen vor, dass es weder eine Aktivierung noch Anergie auslöst, sondern ignoriert wird (Kurts et al. 1999; Ohashi et al. 1991).

Auf eine Phase der Proliferation und Expansion einer T-Zellpopulation durch die antigenspezifische Aktivierung in der Peripherie folgt neben der Bildung von Gedächtniszellen häufig auch eine Deletion dieser T-Zellen. Bei der Aktivierung der reifen T-Zellen werden nicht nur Effektorfunktionen induziert, sondern auch Apoptose hemmende Proteine wie Bcl-2 herunterreguliert, während an der Apoptose-Induktion beteiligte Rezeptoren wie Fas heraufreguliert werden. Dieser als aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD, activation induced cell death) bezeichnete Mechanismus dient möglicherweise der Kontrolle oder Regulation einer normalen antigenspezifischen, zellulären Immunreaktion und kann zudem zur Erhaltung der peripheren Toleranz bei der Aktivierung von T-Zellen durch Autoantigene beitragen (Fowlkes & Ramsdell 1993; Sprent & Webb 1995; Seder & Ahmed 2003). Ein weiterer Mechanismus, der allgemeine immunregulatorische Funktionen hat und

einen Beitrag zur peripheren Toleranz leistet, beinhaltet regulatorische T-Zellen. Dies wird durch das Vorkommen von Autoimmunerkrankungen in Assoziation mit Störungen in der Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen bekräftigt. Regulatorische T-Zellen können in einem aktiven Prozess die Proliferation und die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen sowie Effektorfunktionen differenzierter T-Zellen supprimieren. Dies erfolgt durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine oder zellkontaktabhängige Mechanismen. Dabei treten die Zellen direkt mit der T-Effektorzelle oder mit einer antigenpräsentierenden Zelle in Kontakt, wodurch die Interaktion der T-Effektorzelle mit der antigenpräsentierenden Zelle unterbunden oder moduliert wird (Sakaguchi et al. 2008).

1.3 Das Immunprivileg des Auges

Die zuvor beschriebenen Abläufe und Wechselwirkungen angeborener und adaptiver Immunreaktionen können in unterschiedlichen Bereichen, Geweben und Organen variieren, da dort unterschiedliche immunbiologische Rahmenbedingungen und zelluläre Zusammensetzungen bestehen (Streilein 1999). Gerade das Auge nimmt diesbezüglich eine hervorzuhebende Sonderstellung ein und wird auch als immunprivilegierter Bereich bezeichnet. Der Begriff Immunprivileg beruht auf der Eigenschaft, dass Tumorzellen oder Gewebe, die in die Vorderkammer des Auges transplantiert werden, nicht sofort vom Immunsystem abgestoßen bzw. eliminiert werden, sondern längere Zeit überleben und Tumorzellen Tumore bilden können (Medawar 1948; Greene 1949; Streilein 1999). Da dem Augeninneren weitestgehend ein lymphatischer Abfluss fehlt, kommen okuläre Antigene möglicherweise nur eingeschränkt in peripheren Lymphorganen mit dem Immunsystem in Kontakt. Diese Eigenschaft der immunologischen Ignoranz wurde als Mechanismus für das Immunprivileg des Auges angenommen. Eine weitere anatomische Besonderheit des Auges ist eine Blut-Organ-Schranke, die zu einer Abgrenzung der intraokularen Antigene beiträgt (Medawar 1948; Streilein 1995). Die Blut-Organ-Schranke wird durch die Zonula occludens der retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen), der nicht pigmentierten Epithelzellen des Ziliarkörpers sowie der Endothelzellen retinaler Gefäße und der Gefäße der Iris gebildet. Die Blut-Organ-Schranke erschwert einen Eintritt von Leukozyten und Plasmaproteinen aus der Blutzirkulation in die okulären Gewebe (Cunha-Vaz 1979; Mo et al. 2007). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass in die Vorderkammer des Auges eingebrachte Antigene sekundäre Lymphorgane in löslicher Form über lymphatische und vaskuläre Wege erreichen (Camelo et al. 2006). Daher ist der Mechanismus der immunologischen Ignoranz okulärer Antigene allein nicht aufrecht zu erhalten, sodass der gegenwärtige Kenntnisstand neben den anatomischen

Gegebenheiten besonders biochemische Eigenschaften des Auges und aktive immunologische Prozesse bei der Mitwirkung am Immunprivileg in Betracht zieht. So produzieren okuläre Gewebe Moleküle wie Fas-Ligand, die Apoptose bei infiltrierenden Immunzellen auslösen können, wenn diese die natürlichen Barrieren überwinden und in das Auge einwandern (Griffith et al. 1995; Ferguson & Griffith 2007).

Einen weiteren Beitrag zum immunprivilegierten Status leistet das allgemein immunsuppressive Milieu der okulären Flüssigkeiten, wie im Besonderen das Vorderkammerwasser. Die okulären Gewebe exprimieren konstitutiv verschiedene lösliche Faktoren, die eine Immunsuppression und Immunregulation vermitteln. Diese Faktoren beeinflussen die aktivierende Interaktion von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität, verändern deren Effektorfunktionen und unterdrücken so den Ablauf proinflammatorischer Immunreaktionen. Diese antientzündlichen Effekte des Vorderkammerwassers sind in erster Linie auf den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β_2 (engl. transforming growth factor) und das Melanozyten stimulierende Hormon (α -MSH) zurückzuführen. Eine Kombination dieser Faktoren induziert zudem regulatorische T-Zellen, die proinflammatorische Effektor-T-Zellen aktiv supprimieren. Somatostatin, das ebenfalls als immunsuppressiver Mediator im Mikromilieu des Augeninneren vorkommt, ist in Assoziation mit der Funktion von α -MSH an der antigenspezifischen Aktivierung von regulatorischen T-Zellen beteiligt. Weitere Bestandteile des immunsuppressiven Milieus stellen das Calcitonin-Gen-verwandte Peptid (CGRP) und das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) dar. Der Faktor CGRP supprimiert die LPS induzierte Produktion von Stickoxid (NO) durch Makrophagen, und VIP ist an der partiellen Suppression der Proliferation von T-Zellen beteiligt (Taylor 2007).

Das Mikromilieu des Auges hat zudem einen Einfluss auf die Generierung einer systemischen, abweichenden Immunantwort (Immundeviation) in Reaktion auf Antigene, die in das Auge bzw. die Vorderkammer eingebracht werden, wobei der Ablauf einer klassischen proinflammatorischen Effektorantwort unterdrückt wird (Streilein et al. 1980). Bei diesem als ACAID (engl. anterior chamber-associated immune deviation) bezeichneten immunregulatorischen Phänomen (Streilein & Niederkorn 1981) wird das Antigen von ortsständigen APZ, die unter dem Einfluss des Mikromilieus des Auges stehen, aufgenommen. Die okulären APZ werden von F4/80+ Makrophagen repräsentiert, die sich durch die Expression von IL-10, IL-13, TGF- β , MIP-2 und CD1d auszeichnen, aber kein IL-12 als Faktor für proinflammatorische Th1-Zellen produzieren. Nach der Aufnahme von Antigenen im Auge gelangen die okulären APZ in den Thymus und in die Milz. In der Milz

setzen okuläre APZ Fragmente der Antigene frei, die wiederum von B-Zellen aufgenommen und prozessiert werden. Die B-Zellen fungieren dann ihrerseits als antigenpräsentierende Zellen und induzieren antigenspezifische Suppressorzellen. Die Suppressorzellen unterdrücken schließlich die vermittelnden Effektorzellen einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (DTH; engl. delayed-type of hypersensitivity reaction) bzw. von Entzündungsreaktionen (Nieder Korn 2007). An der ACAID-Induktion in der Milz sind neben den Wechselwirkungen von okulären APZ und B-Zellen auch komplexe Wechselwirkungen mit noch weiteren Zelltypen beteiligt. Dazu zählen α , β T-Zell-Rezeptor-positive und NK1.1-positive natürliche Killer-T-Zellen (Wang et al. 2001; Sonoda et al. 1999), die teilweise durch die okulären APZ im Thymus induziert werden und anschließend in die Milz wandern (Wang et al. 2001), $\gamma\delta$ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen (Wilbanks & Streilein 1990). Aus diesen zellulären Wechselwirkungen gehen zwei verschiedene Populationen antigenspezifischer Suppressorzellen hervor. CD4⁺ Suppressorzellen hemmen die Proliferation proinflammatorischer Effektorzellen in der Induktionsphase der Immunreaktion (afferente T-Suppressorzellen), während CD8⁺ Suppressorzellen (efferente T-Suppressorzellen) bereits generierte Effektorzellen einer bestehenden inflammatorischen Immunreaktion supprimieren (Streilein & Nieder Korn 1985; Wilbanks & Streilein 1990). Damit trägt ACAID durch die Generierung einer systemischen, anti-inflammatorischen Immunreaktion und der Unterdrückung von Entzündungsprozessen mit einhergehender Gewebeerstörung entscheidend zum Immunprivileg des Auges bei (Nieder Korn 2007). Bei einem Funktionsverlust der Mechanismen und Strukturen des Immunprivilegs und einem Ungleichgewicht in dem Netzwerk der verschiedenen beteiligten Faktoren kann die Ausbreitung von Entzündungsreaktionen die Folge sein und zu funktionalen und zum Teil irreversiblen Schäden in den okulären Geweben führen. Bei einer Uveitis kann dies zudem durch Fehlfunktionen der zuvor beschriebenen zentralen und peripheren Toleranzmechanismen mit Autoimmunreaktionen in Zusammenhang stehen. Auf diese entzündliche Augenerkrankung wird im folgenden Abschnitt weiter eingegangen.

1.4 Uveoretinitis

Die Uvea bezeichnet die pigmentierten, gefäßführenden Schichten des Auges und umfasst damit die Iris, den Ziliarkörper und die Choroidea. Eine Uveoretinitis wird durch Entzündungsprozesse definiert, die die Uvea und Retina betreffen und ist damit ein Sammelbegriff für eine Reihe von introkulären, entzündlichen Fehlfunktionen (Caspi 2010). Auf einer anatomischen Kategorisierung basierend wird zwischen einer anterioren,

intermediären und posterioren Uveitis sowie einer Panuveitis unterschieden (Bloch-Michel & Nussenblatt 1987; Jabs et al. 2005). Eine anteriore Uveitis ist durch Entzündungen von Iris und Ziliarkörper sowie exudative Einlagerungen (Fibrin) und die Infiltration von Leukozyten in die Vorderkammer des Auges charakterisiert. Bei einer intermediären Uveitis ist neben peripheren Bereichen der Retina sowie der Pars plana in erster Linie der Glaskörper von der Infiltration von Entzündungszellen betroffen. Entzündungsreaktionen, die vorwiegend die Choroidea und Retina betreffen, kennzeichnen eine posteriore Uveitis. In seltenen Fällen können alle intraokulären Bereiche des Auges entzündet sein, was als Panuveitis bezeichnet wird (Bloch-Michel & Nussenblatt 1987; Jabs et al. 2005). Bei anterioren oder intermediären Uveitiden entstehen Beeinträchtigungen des Sehvermögens in erster Linie durch auftretende Sekundärkomplikationen wie Katarakt, Glaukom oder Makulaödem (Deane & Rosenthal 1997; Carvounis et al. 2006; Woreta et al. 2007; Babu & Rathinam 2010). Da die Retina überwiegend aus weitestgehend irreparabilem Nervengewebe besteht, können mit Gewebeerstörung einhergehende Entzündungsprozesse in diesen Bereichen zu direkten Beeinträchtigungen des Sehvermögens oder sogar zur Erblindung führen. Für das Auftreten einer Uveitis bestehen verschiedene Ursachen. Sie kann beispielsweise als Folge einer Infektion auftreten (Forrester et al., 1990; Ooi et al., 2006). In den USA und in Mitteleuropa gehen schätzungsweise 16 % bis 35% aller Retinochoroiditiden auf eine Toxoplasmose zurück, was damit die häufigste Ursache der posterioren Uveitis darstellt (Tabbara 1990; Pleyer et al. 2007). Ein weiteres Beispiel für eine infektiöse Uveitis ist die okuläre Tuberkulose, die mit einer Inzidenz von 1,4 % bis 5,7 % auftritt. (Sharma et al. 2011; Jakob et al. 2009). Oftmals ist eine Uveitis allerdings autoimmuner, chronischer Natur (endogene Uveitis), wobei sie mit einer generellen immunvermittelten Systemerkrankung assoziiert sein kann. Dabei ist das Auge als eines von mehreren Organen betroffen, wie beispielweise bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA), wo die Uveitis als Begleiterscheinung von Gelenksentzündungen auftreten kann bzw. von einer T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktion gegen Melanozyten der Haut im Falle des Vogt-Koyanagi-Harada Syndroms (Caspi 2010; Fang & Yang 2008). Bei der Sarkoidose, einer granulomatösen inflammatorischen Systemerkrankung, tritt das Auge häufig als erster Manifestationsort von einer Reihe betroffener Organe auf. Die mit einer Sarkoidose assoziierte Uveitis betrifft überwiegend den anterioren Augenabschnitt (Heiligenhaus et al. 2011). Behcet's Disease (BD) ist eine systemische Vaskulitis. Häufige Symptome sind Schleimhautulzerationen im Mund und Genitalbereich sowie Läsionen der Haut. Bei 60 % - 80 % der BD Patienten wird eine Beteiligung des Auges beobachtet, die durch eine posteriore- oder Panuveitis charakterisiert

ist (Deuter et al. 2008). Im Falle einer sympathischen Ophthalmie oder einer Birdshot-Retinopathie ist die Autoimmunerkrankung auf das Auge begrenzt (Caspi 2010). Die posteriore Uveitis ist häufig nicht infektiös (McMenamin et al. 1993), wobei häufig der Begriff der idiopathischen posterioren Uveitis Verwendung findet, da die Etiologie oder Mechanismen, die die auslösenden Fehlfunktionen bedingen, noch weitgehend unbekannt sind. Eine Hypothese ist, dass spezifische Antigene aus dem Auge weniger im Thymus exprimiert sind und zudem durch die Blut-Retina-Schranke abgesondert sind, sodass sich T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor eine Affinität zu okulären Autoantigenen aufweist, den Mechanismen der klonalen Deletion und Inaktivierung häufiger entziehen (siehe Abschnitt 1.2) (Caspi 1992). Der Identifizierung der auslösenden Autoantigene kommt bei der Erforschung von zugrunde liegenden Mechanismen eine bedeutende Rolle zu. Verschiedene Epitope sowohl des bovinen als auch humanen Interphotorezeptor retionoid-bindenden Proteins (IRBP) und Arrestins (S-Antigens) erwiesen sich als uveitogen in tierexperimentellen Uveitis-Modellen. Es ist unklar, ob diese auch beim Menschen immunpathogen sind, es konnte allerdings bei Uveitis-Patienten eine erhöhte Immunreaktion von Lymphozyten auf IRBP und S-Antigen festgestellt werden (Nussenblatt et al. 1982; Matsuo et al. 1986; Caspi 2003). Bei einer sympathischen Ophthalmie führt eine mechanische Verletzung oder ein physikalisches Trauma des Auges mit einer zeitlichen Verzögerung von Wochen oder Monaten zu einer Entzündung des kontralateralen Auges. Es wird angenommen, dass durch die Verletzung intraokuläre Antigene des Auges freigesetzt werden und eine systemische Immunität dagegen ausgebildet wird (Rao et al. 1983; Kilmartin et al. 2000; Castiblanco & Adelman 2009). Bei Uveitis-Fällen ohne physikalische Zerstörung des Auges ist die Vermutung, dass es im Zuge einer Infektion zu einer Immunisierung gegen ein Pathogen kommt, das strukturelle Homologien zu retinalen Proteinen aufweist, was als antigene Mimikry bezeichnet wird. Dadurch werden gleichzeitig autoantigen-spezifische T-Zellen generiert, die eine Uveitis auslösen können (Wildner & Diedrichs-Möhring 2003; Wildner & Diedrichs-Möhring 2005). Auch hier stellt sich die Frage nach den Mechanismen des initialen Eindringens antigenspezifischer, aktivierter T-Zellen in das immunprivilegierte Auge. Diesbezüglich werden Zufallsereignisse vermutet, da nur relativ wenige penetrierende, antigenspezifische T-Zellen auszureichen scheinen, um eine Entzündungskaskade und Rekrutierung unspezifischer Leukozyten zu initiieren (Prendergast et al. 1998; Caspi 2003; Thureau et al. 2004). Aus tierexperimentellen Studien wird abgeleitet, dass antigenspezifische T-Zellen, die in das Auge eintreten, dort auf ihr Antigen treffen und reaktiviert werden. Daraufhin produzieren sie Chemokine und Zytokine, die das immunsuppressive Milieu des

Auges aus der Balance bringen können. Die rekrutierten, nicht spezifischen Effektorzellen wie neutrophile Granulozyten und Monozyten oder Makrophagen vermitteln die inflammatorische Gewebeerstörung im Auge (Caspi 2003; Caspi 2010). Zu den funktionellen, immunologischen und zellulären Vorgängen und Mechanismen bei Ablauf einer Uveitis soll in einem späteren Abschnitt dieser Einleitung zum Thema des tierexperimentellen Uveitismodells noch näher eingegangen werden.

Allein in den USA treten Uveitiserkrankungen nicht infektiösen Ursprungs mit einer Inzidenz von 52,4 pro 100.000 und einer Prävalenz von 115,3 pro 100.000 auf und stellen die Ursache für ca. 10 % der Erblindungen von Patienten im Alter unter 65 Jahren dar (Caspi 1992; Caspi 2003; Forrester et al 1990; Gritz & Wong 2004; Ooi et al 2006).

Auch genetische Komponenten werden mit der Suszeptibilität für Uveitis in Verbindung gebracht. Das Auftreten bestimmter autoimmuner bzw. immunvermittelter Uveitis-Formen beim Menschen ist mit verschiedenen Varianten in Genen des MHC assoziiert. Zusammenhänge mit Uveitis-Erkrankungen wurden sowohl für HLA Klasse I als auch für HLA Klasse II Moleküle festgestellt. Beispiele für solche Korrelation von HLA-Allelen mit Uveitiserkrankungen sind die Assoziation des Allels HLA-A29 mit dem Auftreten von Birdshot Retinochoroidopathy, des Allels HLA-DR4 mit sympathischer Ophthalmie und des Allels HLA-DRw53 mit dem Vogt-Koyanagi-Harada Syndrom. HLA- bzw. MHC Moleküle sind an der Präsentation von Antigenen und deren Erkennung durch T-Zellen beteiligt. Da T-Zellen als zentrale pathogene Vermittler experimenteller und humaner Uveitis gelten, spielen Moleküle, die von Genen der MHC-Genfamilie (HLA-Gene) kodiert werden, eine bedeutende Rolle in der Regulierung von Immunantworten. An der Gestaltung von komplexen Immunreaktionen sind allerdings viele Gene beteiligt, sodass bestimmte HLA-Genotypen nicht die einzige genetische Prädisposition darstellen. An der Erkennung von Antigenen durch T-Lymphozyten und deren Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen sind nicht allein MHC-Moleküle, sondern z.B. auch der entsprechende T-Zell-Rezeptor entscheidend. Dementsprechend können auch Variationen in T-Zell-Rezeptor-kodierenden Genen oder genetische Faktoren, die zentralen und peripheren Toleranzmechanismen sowie der Vermittlung und Regulation von inflammatorischen Aktivierungskaskaden zugrunde liegen, die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Autoimmunität beeinflussen. Uveitis-Erkrankungen stellen daher vielmehr polygene Fehlfunktionen dar (Caspi 1992; Pennesi and Caspi 2002; Caspi 2010).

Die Standardtherapie bei autoimmuner Uveitis besteht in der Regel in einer allgemeinen, nicht spezifischen Immunsuppression. Kortikosteroide bilden dabei die Medikamente der

ersten Wahl. Gerade akute Entzündungsschübe werden mit der topischen Gabe bei anterioren Uveitiden oder der systemischen Gabe bei posterioren Uveitiden von schnell wirksamen, antientzündlichen Kortikosteroiden wie Prednisolon oder Dexamethason behandelt (Lightman & Kok 2002; Taylor et al. 2010). Bei der Behandlung von chronischen Uveitisverläufen wird zur Senkung der Kortikosteroiddosis mit immunsuppressiven Wirkstoffen wie z.B. Azathioprin, Methotrexat, Mycophenolat Mofetil oder Cyclosporin A behandelt. Die Kombination von Kortikosteroiden mit solchen immunsuppressiven Wirkstoffen ist häufig erforderlich, da sich deren Wirkung in der Regel erst nach Monaten einstellt. Azathioprin und Methotrexat sind Antimetabolite, die auf Ebene der Zellreplikation eingreifen. Eine weitere Gruppe immunsuppressiver Substanzen bilden T-Zell-Inhibitoren, wozu Cyclosporin A oder Tacrolimus gehören. Mit einer länger andauernden, immunsuppressiven Therapie können schwere Nebenwirkungen verbunden sein. Diese reichen von einer erhöhten Infektanfälligkeit bis hin zu Fehlfunktionen von Leber und Nieren, Osteoporose, Infertilität, Hyperglykämie oder psychischen Beeinträchtigungen (Heiligenhaus et al. 2010; Lightman & Kok 2002). Daher besteht ein neuerer Therapieansatz in der Reduktion der Immunsuppressiva unter gleichzeitiger, systemischer Gabe von sogenannten Biologika. Biologika sind biotechnologisch hergestellte Substanzen mit immunmodulatorischen Eigenschaften. Sie treten mit Zielmolekülen in Wechselwirkung, die entscheidend an der Pathogenese von autoimmunen Entzündungserkrankungen beteiligt sind. So werden beispielsweise Antikörper gegen entzündungsvermittelnde Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α (Infliximab, Adalimumab) oder IL-17 (AIN457) oder gegen die Rezeptoren solcher Zytokine auf entsprechenden Zielzellen wie IL-6 Rezeptoren (Tocilizumab) oder IL-2 Rezeptoren (Daclizumab) als Biologika bei verschiedenen autoimmunen Erkrankungen eingesetzt. Weitere vielversprechende Zielmoleküle sind Adhäsionsmoleküle, die das Eindringen von Entzündungszellen in das Gewebe ermöglichen. Zur Behandlung von Uveitiserkrankungen ist eine weitreichende und erfolgreiche Verwendung von TNF- α -Inhibitoren beschrieben (Heiligenhaus et al. 2010; Lightman & Kok 2002). Der Einsatz von Biologika setzt wachsende Kenntnisse über die zugrundeliegenden pathogenen Mechanismen immunvermittelter Erkrankungen voraus. Da hierzu tierexperimentelle Krankheitsmodelle in besonderer Weise beigetragen haben, soll im folgenden Abschnitt auf das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Uveoretinitis eingegangen werden.

1.5 Experimentelle autoimmune Uveoretinitis (EAU)

Uveitismodelle bieten Einblicke in die Beteiligung, Interaktion und Eigenschaften von Effektorzellen sowie in Signalwege und pathologische Veränderungen von Zielgewebe bei entzündlichen Augenerkrankungen. Die experimentelle Induktion von verschiedenen Uveitisformen ist in Primaten, Meerschweinchen, Kaninchen und Mäusen beschrieben. Keines dieser Tiermodelle vermag das gesamte Spektrum humaner Uveitiserkrankungen abzudecken. Da sich diese Tiermodelle allerdings in vielerlei Hinsicht unterscheiden, wie beispielsweise in der Verwendung des Antigens zur Modellinduktion und damit auch in dem betroffenen Bereich des Auges und den entsprechenden pathologischen Befunden, können bestimmte einzelne Aspekte und Eigenschaften okulärer Entzündungserkrankungen beleuchtet werden. Damit bilden verschiedene tierexperimentelle Modelle für bestimmte Uveitisformen die Basis für die Erforschung entscheidender pathogener Parameter und Entwicklung immunotherapeutischer Behandlungsansätze (McMenamin et al. 1993; Caspi 2006).

Die Endotoxin-induzierte Uveitis (EIU) gilt als Modell für eine akute anteriore Uveitis und bietet eine Möglichkeit zur Untersuchung der häufig beobachteten Assoziation einer solchen Uveitisform mit einer bakteriellen Infektion. Bei einer EIU führt die systemische Injektion von bakteriellem LPS in Ratten oder Mäuse zu einer Aktivierung von Komponenten und Mechanismen der angeborenen Immunität. Dabei spielen LPS-aktivierte Makrophagen eine zentrale Bedeutung. Die systemische Aktivierungs- und Entzündungskaskade führt zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen (möglicherweise auch eine direkte Folge der Wirkung des Endotoxins auf Endothelzellen) und dem Eintritt von Entzündungszellen in uveale Gewebe, wovon in erster Linie Gewebe des vorderen Augenabschnitts wie Ziliarkörper, Iris und Vorderkammer betroffen sind. Der Höhepunkt der Erkrankung mit einer maximalen Anzahl infiltrierender Entzündungszellen wird bereits 24 Stunden nach der LPS-Injektion erreicht und bildet sich anschließend nahezu vollständig zurück (Rosenbaum et al. 1980; Bhattacharjee et al. 1983; Cousins et al. 1984; McMenamin & Crewe 1995; Smith et al 1998; Caspi 2006).

Ein weiteres Tiermodell für eine humane akute anteriore Uveitis ist die experimentelle Melanin-induzierte Uveitis (EMIU) bzw. experimentelle akute anteriore Uveitis (EAAU). Dieses Modell weist einige Parallelen zur humanen akuten anterioren Uveitis in Form eines relativ lang anhaltenden aktiven Entzündungsverlaufs, einer langsamen Regression der Entzündung, spontan auftretenden Rezidiven sowie der Lokalisation der Entzündung in der anterioren Uvea auf. Während bei einer EIU auch Zellinfiltrationen in Vitreus und Retina und

damit einhergehende fokale Zerstörungen von Photorezeptoren beobachtet wurden, ist die EMIU/EAAU nahezu ausschließlich auf die anterioren Bereiche der Uvea und die Vorderkammer beschränkt. Da die Entwicklung einer EMIU/EAAU durch die Applikation von Cyclosporin A effektiv unterbunden werden kann, gilt das Modell als eine autoimmune, T-Zell-vermittelte Erkrankung. Die EMIU/EAAU wird durch die Immunisierung von Ratten mit Melanin, das z.B. aus der Iris extrahiert und aufgereinigt wurde, induziert. Eine Besonderheit dieses Modells ist, dass eine anteriore Uveitis auch durch die Immunisierung mit Melanin aus der Choroidea, dem retinalen Pigmentepithelium oder sogar der Haut ausgelöst werden kann (Broekhuysen et al. 1992; Ruiz-Moreno et al. 1992; Broekhuysen et al. 1993; Smith et al. 1998).

Eine anteriore und posteriore Uveitis bzw. deren Modelle EAAU und EAU unterscheiden sich dadurch, dass die anteriore Uveitis eher eine akute vorübergehende Störung ist, während bei einer posterioren Uveitis irreparable Zerstörungen und Degenerationen von Netzhautgewebe persistieren (Broekhuysen et al. 1993).

Das unterstreicht die Bedeutung eines Tiermodells für die humane autoimmune posteriore Uveitis. Die EAU ist ebenfalls eine T-Zell-vermittelte Erkrankung, die als Modell für Entzündungsprozesse endogener Ursache in den posterioren uvealen Geweben des Auges einschließlich der Retina dient (Caspi et al. 1988). Bereits im Jahre 1952 gelangen erste Versuche, spezifische pathologische Veränderungen in der Uvea durch Immunisierung von Meerschweinchen oder Affen mit homogenisiertem Uvea-Gewebe hervorzurufen. Ein besser reproduzierbares Uveitismodell wurde später durch die systemische Applikation von homogenisierten Netzhautextrakten in Emulsion mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA; engl. complete Freund's adjuvant) etabliert, wobei Meerschweinchen klinische und histologische Entzündungszeichen in allen Bereichen der Uvea sowie der Retina, dem Vitreus und der Vorderkammer entwickelten (Wacker & Lipton 1968). Für die Untersuchung grundlegender Mechanismen finden heute überwiegend die EAU-Modelle der Ratte und der Maus Verwendung. Gerade die Maus ist ein immunologisch und genetisch sehr gut charakterisierter, definierter und standardisierter Organismus. Zudem existiert besonders auf dem Hintergrund des Uveitis suszeptiblen C57BL/6-Mausstamms eine Reihe von genmanipulierten Tieren. So hat die EAU-Induktion in „Knockout“ oder transgenen Tieren zu einem wachsenden Verständnis der komplexen Mechanismen, der beteiligten Mediatoren und deren Funktionen beigetragen (Caspi 2006).

Klassischerweise erfolgt die EAU-Induktion durch Immunisierung von Ratten oder Mäusen mit retinalen Antigenen in Kombination mit entsprechenden Adjuvantien. Zur Immunisierung

können ganze Extrakte der Retina, einzelne aufgereinigte retinale Antigene oder Peptidsequenzen dieser Antigene eingesetzt werden (Caspi 2006). Es wurden verschiedene retinale Antigene beschrieben, die uveitogen in der Ratte sind. Neben der hoch reproduzierbaren und meist verwendeten Modellinduktion mit S-Antigen (McMenamin 1993) konnte auch mit Rhodopsin/Opsin (Schalken et al. 1988; Broekhuysen et al. 1991), Phosducin (Dua et al. 1992) und IRBP (Broekhuysen et al. 1986; Fox et al. 1987) eine Uveitis ausgelöst werden. Letzteres ist ein evolutiv hoch konserviertes Molekül, welches in der extrazellulären Matrix der Photorezeptoren lokalisiert und am Transport von Retinal zwischen dem retinalen Pigmentepithelium und den Photorezeptor-Zellen beteiligt ist (Redmond et al. 1985; Okajima et al. 1990).

IRBP bzw. einzelne Peptidsequenzen davon stellten sich auch als uveitogen in der Maus heraus, die bis zur Modelletablierung in dieser Spezies Ende der 80iger Jahre als resistent für die EAU-Induktion galt (Caspi et al. 1988; Caspi et al. 1990b). Die Suszeptibilität für die IRBP-induzierte EAU bei der Maus ist abhängig vom Haplotyp der H-2 Gene (Gene des MHC der Maus). Suszeptible H-2 MHC-Haplotypen sind beispielsweise H-2b, H-2k und H-2r. Dementsprechend wurden auch unterschiedlich suszeptible Mausstämme gefunden (Caspi et al. 1992). Der bis heute bekannte Mausstamm mit der stärksten Suszeptibilität ist der B10.RIII-Mausstamm (B10.RIII [H-2r] > B10.A > C57BL/6 [H2-b]) (Caspi 2006; Caspi 2010).

Die Auslösung des EAU-Modells erfolgt bei der Maus stets durch die subkutane Immunisierung mit dem uveitogenen IRBP-Peptid in Kombination mit CFA und meist einer zusätzlichen intraperitonealen Gabe von Pertussis Toxin (PTX). Nur bei der B10.RIII-Maus ist bisher auch eine EAU-Induktion ohne zusätzliche Applikation von PTX beschrieben worden (Silver et al. 1999). Die bei der Immunisierung eingesetzten Adjuvantien haben eine entscheidende Bedeutung bei der Aktivierung der APZ, die das injizierte Peptid aufnehmen und IRBP-spezifischen T-Zellen präsentieren. Durch bakterielle Bestandteile, wie sie in CFA enthalten sind, aktivierte Makrophagen (siehe Abschnitt 1.1) beispielsweise erzeugen ein Zytokinmilieu, was im Zusammenhang mit der adaptiven Immunität die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen fördert (Caspi 2006; Caspi 2003). Neben der Eigenschaft, den Zusammenbruch von Blut-Gewebe-Schranken durch eine erhöhte Permeabilität von Blutgefäßen zu begünstigen (Linthicum et al. 1982), soll ein Adjuvans-Effekt auch von PTX in der Verstärkung einer Th1-Antwort liegen (Silver et al. 1999).

Dementsprechend gelten Th1-Zellen als eine zentrale uveitogene T-Zelllinie. Ratten, die auf ihrem genetischen Hintergrund basierend eine Th1-dominante Immunantwort, die mit einer

starken IFN- γ -Expression assoziiert ist, generierten, zeigten eine erhöhte Suszeptibilität für eine EAU. Ein weitestgehend EAU-resistenter Rattenstamm zeigte hingegen eine geringere IFN- γ -Antwort (Caspi et al. 1996). IL-12 p40-defiziente Mäuse, bei denen die Signalwirkung von IL-12 ausgeschaltet ist, waren resistent gegen eine IRBP-induzierte EAU (Tarrant et al. 1998). Da IL-12 das entscheidende Zytokin für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen ist und sowohl eine Rolle während der Phase des sogenannten Priming als auch in der Effektor-Phase spielt, unterstreicht die EAU-Resistenz der IL12-defizienten Mäuse die Bedeutung einer Th1-dominanten Immunantwort für die Pathogenese einer EAU (Manetti et al. 1993; McKnight et al. 1994; Tarrant et al. 1998). In jüngerer Zeit wurde neben Th1 noch eine weitere uveitogene T-Zelllinie beschrieben, deren zentrales Zytokin das IL-17 ist, was die Bezeichnung als Th17-Zelle begründet (Yao et al. 1995; Amadi-Obi et al. 2007). Es wird angenommen, dass die Bedingungen während der Induktion der Erkrankung bei der initialen Antigenexposition und deren Art einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, welcher Effektortyp (Th1 oder Th17) der dominierende Vermittler des EAU-Modells ist (Luger et al. 2008; Tang et al. 2007). Nach neueren Erkenntnissen gilt gerade bei der Modellinduktion durch Immunisierung mit einem retinalen Antigen in Emulsion mit CFA die Th17/IL-17-Antwort als dominanter Vermittler. Allerdings können auch IL-17 Knockout (KO)-Mäuse eine EAU nach einer aktiven Immunisierung entwickeln, was aufzeigt, dass das vollständige Ausschalten eines Mechanismus durch andere vermittelnde Mechanismen kompensiert werden kann (Luger et al. 2008). Das spricht für sehr komplexe Vorgänge bei der Entstehung einer Uveitis und die Beteiligung sowie das Ineinandergreifen verschiedener Effektor-Subtypen.

Dass sowohl Th17- als auch Th1-Zellen wichtige pathogene Vermittler bei einer EAU sind und uveitogenes Potenzial haben, zeigt zudem die Möglichkeit der Uveitis-Induktion durch den Transfer von T-Zellen beider Phänotypen. Bei der Modellinduktion durch adoptiven Transfer werden genetisch kompatiblen Empfängertieren antigen-spezifische, uveitogene T-Zellen von immunisierten Spendertieren injiziert (Agarwal & Caspi 2004; Caspi et al. 1986; Mochizuki et al. 1985). Bei der erforderlichen *in vitro* Restimulierung mit dem entsprechenden retinalen Antigen können die uveitogenen T-Zellen durch den Zusatz von IL-12 oder einer Kombination von IL-23, TGF- β und IL-6 in die Richtung des Th1- bzw. Th17-Phänotyps polarisiert werden (Luger et al. 2008; Manetti et al. 1993; Agarwal & Caspi 2004; Bettelli et al. 2006). Sowohl der adoptive Transfer von IFN- γ produzierenden Th1-Zellen als auch die Übertragung von IL-17 produzierenden Th17-Zellen konnte eine Uveitis bei den Empfängertieren auslösen. Dabei übertragen Th17-Zellen die Uveitis unabhängig von IFN- γ ,

wie es Experimente zum adoptiven Transfer in IFN- γ KO-Mäusen zeigten. Umgekehrt konnten uveitogene Th1-polarisierte Zellen eine Uveitis unabhängig von IL-17 übertragen, wenn bei den Empfängertieren IL-17 durch monoklonale Antikörper neutralisiert wurde (Luger et al. 2008; Saoudi et al. 1993; Caspi et al. 1996). Die Übertragung von T-Zellen mit einem Th2-Profil (starke Expression von IL-4 und IL-10) hatte hingegen keinen pathogenen Effekt und löste keine Uveitis aus (Saoudi et al. 1993). Von Th2-Zellen wird angenommen, dass sie eine eher protektive Funktion haben und mit ihrer Produktion von IL-10 eine entscheidende Rolle bei der Auflösung und Abheilung der Entzündung in der Resolutionsphase der EAU spielen (Caspi 2003; Rizzo et al 1998).

Auch der Transfer von Immunserum aus aktiv immunisierten Spendertieren (HLA transgene Mäuse) löste in syngenem Empfängern keine EAU aus. Wurde das Immunserum allerdings in Kombination mit uveitogenen T-Zellen injiziert, war die EAU etwas stärker ausgeprägt als nach adoptivem Transfer uveitogener T-Zellen allein. Das spricht in dem Zusammenhang der pathologischen Prozesse einer EAU für eine untergeordnete Rolle von Antikörpern, die eine EAU nicht initiieren, aber verstärken können (Pennesi et al. 2003).

Wie es die Übertragung einer Uveitis in Empfängertiere durch T-Zellen, die spezifisch für ein retinales Antigen sind, aufzeigt, gilt die EAU wie die humane endogene Uveitis als eine T-Zell-vermittelte Erkrankung (Mochizuki et al. 1985; Caspi et al. 1986). Es konnte gezeigt werden, dass für ein retinales Antigen spezifische T-Zellen und durch ein Mitogen aktivierte, unspezifische T-Zellen mit gleicher Wahrscheinlichkeit, Kinetik und Anzahl in das Auge einwandern. Im Gegensatz zu unspezifisch aktivierten T-Zellen treten die antigen-spezifischen T-Zellen dort allerdings mit ihrem spezifischen Antigen und residenten APZ in Wechselwirkung, was zu einer Reaktivierung der T-Zellen, der Produktion von Zytokinen und Chemokinen und damit der weiteren Rekrutierung von Entzündungszellen führt. Relativ wenige dieser antigen-spezifischen T-Zellen sind ausreichend und stellen eine wichtige Voraussetzung für die Initiierung und Entwicklung einer Entzündungsreaktion in Uvea und Retina dar. Die Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrates der efferenten Phase besteht überwiegend aus rekrutierten Antigen-unspezifischen Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, wobei mononukleäre Zellen dominieren, aber der Anteil der antigen-spezifischen T-Zellen nur noch relativ gering ist (Caspi et al., 1993; Prendergast et al. 1998; Caspi 1999; Jiang et al. 2008; Tang et al. 2007). Diese efferente Phase der EAU ist durch die Produktion von Zytokinen, Mediatoren und Substanzen geprägt, die pathologische Veränderungen und Zerstörung der okulären Gewebe und Photorezeptoren vermitteln. Dabei spielen Makrophagen als Produzenten zytotoxischer

Stickoxidverbindungen (Hoey et al. 1997; Forrester et al. 1998; Robertson et al. 2002; Robertson et al. 2003; Zhang et al. 1999) und infiltrierende polymorphkernige Leukozyten als Produzenten reaktiver Sauerstoffverbindungen eine zentrale Rolle (Gritz et al. 1991; Rao et al. 1987).

Die bei der B10.RIII-Maus durch aktive Immunisierung mit dem retinalen Antigen IRBP bzw. dessen Peptid mit den Aminosäuren 161 bis 180 (IRBPp161-180) und CFA sowie PTX als Adjuvantien induzierte EAU ist durch einen monophasischen und akuten Verlauf charakterisiert. Die ersten Entzündungszeichen setzen ca. an Tag 9 nach der aktiven Immunisierung ein. In dieser Phase treten die ersten Entzündungszellen in das Auge ein. Bald darauf erreicht die Entzündung ihren Höhepunkt. An den Tagen 12 bis 14 nach der Immunisierung ist die zelluläre Infiltration am stärksten, die anschließend wieder abnimmt. Strukturelle Zerstörungen der okulären Gewebe bleiben in dieser Phase erhalten. An Tag 21 nach der Immunisierung ist die Entzündung teilweise noch aktiv, allerdings mit stark reduzierter Zellinfiltration. Es setzt eine Resolutionsphase ein, in der im Zuge von Reparaturprozessen degenerierte Bereiche der Retina und anderer okulärer Gewebe durch fibrotisches Gewebe oder Narbengewebe ersetzt wird. Durch unterschiedliche Dosierungen des immunisierenden Antigens oder des Adjuvans können die Schwere und der zeitliche Verlauf der EAU variieren (Xu et al. 2004; Jiang et al. 1999; Hankey et al. 2001; Caspi et al. 1990a; Silver et al. 1999). Die Kinetik der EAU-Entwicklung ist nach Induktion durch adoptiven Transfer beschleunigt. Bereits nach 4 bis 6 Tagen setzen Entzündungszeichen in Form von Zellinfiltrationen in Retina, Vitreus und Vorderkammer ein. Die pathologischen Veränderungen der okulären Gewebe nach adoptivem Transfer decken sich mit denen nach der Modellinduktion durch aktive Immunisierung mit dem retinalen Antigen (Prendergast et al. 1998; Agarwal & Caspi 2004; Caspi et al. 1986; Mochizuki et al. 1985).

Zu den prominenten pathologischen Veränderungen der IRBP-induzierten Uveitis bei der Maus zählen die Perivaskulitis (Infiltration von Entzündungszellen aus den Gefäßen in der Ganglienzellschicht), Fältelungen der Retina, Netzhautablösungen mit serösem Exudat, der Ausfall von Photorezeptoren in fokalen oder großflächigen Läsionen, subretinale Neovaskularisationen sowie die Bildung von Granulomen in der inneren und äußeren Körnerschicht. Auch die Bildung von Dalen-Fuchs-Knoten-artigen granulomatösen Läsionen zwischen Choroidea und Retina treten regelmäßig auf. Damit spiegelt gerade das Mausmodell der EAU charakteristische histopathologische und klinische Eigenschaften der humanen posterioren Uveitis wieder (Caspi et al. 1988; Chan et al. 1990; Forrester et al. 1990; Forrester et al. 1992).

1.6 Das Zielmolekül Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

Tumornekrosefaktor erhielt seine Bezeichnung aufgrund der Eigenschaft, nekrotische Veränderungen bzw. den Verfall von Tumorgewebe auszulösen (Old 1985). Bereits seit den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts war bekannt, dass bakterielle Polysaccharide, sogenannte Endotoxine, Blutungen und Nekrosen von Tumoren verursachen können (Shear & Perrault 1944). Im Jahr 1975 wurde publiziert, dass die Infektion von Mäusen, Ratten und Kaninchen mit bestimmten Bakterien sowie eine Behandlung mit Endotoxin die Produktion und Freisetzung einer Substanz in das Blut auslösen, die eine nekrotische Reaktion von Tumorlinien vermittelt. Wurde Empfängertieren mit transplantierten Tumoren das Serum von bakteriell infizierten und Endotoxin-behandelten Tieren injiziert, konnte eine Rückbildung des Tumorgewebes beobachtet werden. Der Endotoxin-induzierte und in das Serum freigesetzte Faktor, der das Absterben des Tumorgewebes vermittelte, wurde als Tumornekrosefaktor (TNF) bezeichnet. Dass Rückstände des Endotoxins im Serum für dessen Aktivität verantwortlich waren, konnte ausgeschlossen werden. Auch *in vitro* wurde ein zytotoxischer Effekt von TNF auf Tumorzelllinien nachgewiesen (Carswell et al., 1975).

TNF- α ist das namensgebende Mitglied einer ganzen TNF-Familie von Zytokinen. Bereits im Jahr 1968 wurde Lymphotoxin als ein von Lymphozyten produzierter Faktor mit zytotoxischen Eigenschaften charakterisiert (Kolb & Granger 1968; Granger & Kolb 1968). Mit der Entschlüsselung der genetischen Codes von Lymphotoxin und Tumornekrosefaktor wurden sequentielle Ähnlichkeiten festgestellt, die sich auch in den funktionellen Eigenschaften dieser Faktoren widerspiegeln. Beide Faktoren teilen sich Rezeptoren auf den Zielzellen, was zu der Bezeichnung von Tumornekrosefaktor als TNF- α und Lymphotoxin als TNF- β führte (Pennica et al. 1984; Shalaby et al. 1985; Paul & Ruddle 1988; Loetscher et al. 1991).

TNF- α ist ein integrales Typ II Transmembranprotein, was von bestimmten Zelltypen bei Aktivierung synthetisiert und auf der Zelloberfläche exponiert wird. Dabei liegt das Aminoende des Proteins innerhalb des Zytoplasmas, während das Carboxylende eine extrazelluläre Domäne bildet. Die Effekte von TNF- α können über einen Zell-Zell-Kontakt zwischen TNF produzierenden Zellen und den Zielzellen vermittelt werden, wobei die membranständige Form von TNF- α mit entsprechenden Rezeptoren der Zielzellen interagiert, oder über eine lösliche Form von TNF- α . Die lösliche Form von TNF- α wird von der membranständigen Form proteolytisch abgespalten und bindet anschließend an den Rezeptoren der Zielzellen (Kriegler et al. 1988; Grell et al. 1995; Perez et al. 1990). Die proteolytische Spaltung erfolgt zwischen den Aminosäuren Alanin (76) und Valin (77) der

extrazellulären Domäne durch eine Metalloproteinase der Adamalysin-Familie, die als TACE (TNF- α -converting enzyme) bezeichnet wird (Black et al. 1997). Die Hauptproduzenten von TNF- α sind aktivierte Monozyten und Makrophagen. Dabei sind bakterielle Bestandteile, besonders LPS, oder andere Pathogene potente Auslöser der TNF- α -Produktion. Auch TNF- α selbst kann seine eigene Expression durch Makrophagen induzieren. Zu weiteren wichtigen Produzenten von TNF- α zählen Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen (Vassalli 1992; Männel & Echtenbacher 2000; Ooi et al. 2006).

Sowohl die Struktur der membranständigen als auch der löslichen Form von TNF- α besteht in einem Homotrimer. Die Trimer-Bildung der membranständigen TNF-Form aus drei 26 kDa großen Untereinheiten erfolgt relativ rasch nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum noch vor Erreichen der Plasmamembran (Tang et al. 1996). Die von der membranständigen Form abgespaltene lösliche Form ist ein kompaktes, glockenförmiges oder konisches Homotrimer (51 kDa) aus drei gleich gestalteten 17 kDa Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten ist aus antiparallelen β -Faltblattstrukturen aufgebaut (Jones et al. 1989; Eck & Spang et al. 1989). Die trimere Struktur spielt eine wichtige Rolle für die biologische Wirkung von TNF- α (Tang et al. 1996).

Die Wirkung von TNF- α wird über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der entsprechenden Zielzellen vermittelt. Es wurden zwei verschiedene TNF-Rezeptoren identifiziert und anhand ihres Molekulargewichtes von 55 kDa (TNF-R1 oder p55TNF-R) bzw. 75 kDa (TNF-R2 oder p75TNF-R) differenziert (Brockhaus et al. 1990). Während die membranständige Form von TNF- α beide TNF-Rezeptoren aktiviert, wird das Signal der löslichen Form von TNF- α in erster Linie über den TNF-R1 und nur eingeschränkt über den TNF-R2 vermittelt (Grell et al. 1995). Die TNF-Rezeptor-Familie zeichnet sich durch Cystein-reiche Motive variabler Anzahl in der extrazellulären Domäne aus. Die extrazelluläre Domäne des TNF-R1 und des TNF-R2 enthält vier Cystein-reiche Motive, die ohne starke Überlappung linear aneinandergereiht sind. Dieser längliche extrazelluläre Fortsatz tritt mit den Gruben oder Furchen an der Verbindungsstelle von zwei Untereinheiten des TNF-Trimers in Wechselwirkung. Damit besitzt ein TNF-Molekül drei Bindungsstellen für den TNF-Rezeptor (Wajant et al. 2003; Banner et al. 1993). Die extrazelluläre TNF-bindende Domäne des Rezeptors kann proteolytisch abgespalten werden. Diese lösliche Form des TNF-Rezeptors behält seine TNF-bindenden Kapazitäten mit reduzierter Affinität und kann so als endogener TNF-Inhibitor fungieren (Wajant et al. 2003; Engelmann et al. 1990).

Bei Bindung von TNF- α an den TNF-R1 werden auf der intrazellulären Seite des Rezeptors Signalkomplexe unter der Beteiligung von TRAF2 (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2) oder

FADD (engl. Fas-associated via death domain) gebildet. Der TNF-R1/TRAF2-Signalkomplex vermittelt die Induktion verschiedener Zell-aktivierender Signalwege. Dazu zählt die Aktivierung von NF κ -B, der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) oder der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (p38-MAPK). NF κ -B stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von entzündungsassoziierten Genen und antiapoptotischen Faktoren dar. JNK verstärken bei Aktivierung die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die an zellulären Prozessen, wie Proliferation und Differenzierung regulierend beteiligt sind. Über diesen Weg werden beispielsweise Kollagenasen, MCP-1 und E-Selektin reguliert. Der p38-MAPK-Signalweg aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren und induziert die IL-1- und IL-6-Produktion bzw. hält diese aufrecht und gilt damit als weiterer, entscheidender Vermittler entzündlicher Prozesse (Gupta 2002; Aggarwal 2003; Wajant et al. 2003; Bradley 2008).

Über die Bildung von intrazellulären TNF-R1/FADD-Signalkomplexen können durch TNF- α Zelltod-auslösende Prozesse ausgelöst werden. Der FADD-abhängige Signalkomplex ist über die Induktion von Caspase3 an der Vermittlung von Apoptose beteiligt. Ob über den FADD-Signalweg Apoptose oder Nekrose ausgelöst wird, wird über ein komplexes Netzwerk von Faktoren bestimmt, die in den intrazellulären Signalkomplex rekrutiert werden (Gupta 2002; Aggarwal 2003; Wajant et al. 2003; Bradley 2008).

Der TNF-R2 besitzt im Gegensatz zum TNF-R1 keine intrazelluläre Todesdomäne. Die Bindung von TNF- α an den TNF-R2 kann in einem Signalkomplex resultieren, der Apoptose-hemmende Proteine rekrutiert. Daher wird der TNF-R2 in erster Linie mit der Vermittlung von Signalen für das Überleben der Zelle in Verbindung gebracht. Über einen indirekten Weg kann der TNF-R2 allerdings auch an der Vermittlung von Apoptose beteiligt sein. Die Apoptoseinduktion durch den TNF-R2 beruht partiell auf der Induktion der endogenen Produktion der membrangebundenen Form von TNF- α , die wiederum den TNF-R1 stimuliert. Zudem kann der TNF-R2 einen Signalkomplex bilden, der die TNF-R1-abhängige Apoptose durch die Degradierung des antiapoptotischen TNF-R1/TRAF2-Komplexes verstärkt (Gupta 2002; Aggarwal 2003; Wajant et al. 2003; Bradley 2008).

Dieser Zusammenhang zeigt auf, dass die verschiedenen TNF-Rezeptor-abhängigen Signalwege durch ein komplexes Netzwerk interagierender, sich gegenseitig regulierender, hemmender und aktivierender Faktoren miteinander verknüpft sind. Diese Vernetzung und Wechselwirkung verschiedener Signalwege ermöglicht eine hohe Flexibilität im zellulären Verhalten auf ein TNF-Signal (Wajant et al. 2003). Der TNF-R2 wird in erster Linie von Immunzellen und Endothelzellen exprimiert. Während die Expression dabei einer starken Regulation unterliegt, wird der TNF-R1 von den Zellen der meisten Gewebe konstitutiv

exprimiert. Daher entspricht TNF- α einem pluripotenten Zytokin mit vielseitigen biologischen Funktionen (Männel und Echtenacher 2000; Aggarwal 2003).

Die oben bereits im Kontext der Regression von Tumorzellen angesprochenen zytotoxischen Effekte von TNF- α spielen auch bei der Eliminierung infizierter Zellen eine wichtige Rolle. TNF- α ist zudem durch die Aktivierung von Makrophagen, Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu Infektionsherden und Förderung der Migration von dendritischen Zellen und damit der Antigenpräsentation entscheidend an der Vermittlung der antimikrobiellen Immunabwehr und Beseitigung bakterieller Erreger beteiligt (Männel & Echtenacher 2000). Das Ausschalten oder die Hemmung der Signalgebung durch TNF- α führte zu einer erhöhten Sterblichkeit bei der Infektion von Mäusen mit verschiedenen Erregern wie *Candida albicans* oder *Mycobakterium tuberculosis* (Marino et al. 1997; Flynn et al. 1995). Auf der anderen Seite erhöht die Hemmung von TNF- α die letale Dosis von LPS, während die Injektion von rekombinantem TNF- α ähnliche pathologische Effekte und physiologische Störungen wie Endotoxin auslöst. Das legt eine maßgebliche Rolle von TNF- α bei der Vermittlung von einem durch Endotoxin induzierten septischen Schock nahe (Beutler et al. 1985; Tracey et al. 1986; Marino et al. 1997). Bei einer Infektion mit *Corynebakterium parvum* entwickelten TNF- α -defiziente (TNF^{-/-}) Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verspätete, aber sehr starke Entzündungsreaktion mit letalen Folgen. Bei den entsprechenden Wildtyp-Mäusen entwickelten sich nach einer initialen Immunreaktion Granulome, eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz sowie eine Hepatosplenomegalie, was aber nach einer Resolutionsphase wieder den morphologischen Normalzustand erreichte. Diese Ergebnisse sprechen auch für vielseitige, regulatorische Funktionen von TNF- α bei Entzündungsprozessen mit Einfluss auf deren Intensität und Dauer (Marino et al. 1997).

Proinflammatorische Eigenschaften von TNF- α manifestieren sich in der Induktion von Transkriptionsfaktoren, die die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Entzündungszellen wie Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und T-Zellen vermitteln. Durch die Aktivierung von Makrophagen wird die Produktion Gewebe schädigender Stickoxidverbindungen sowie weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine induziert. Damit ist TNF- α ein bedeutender Teil einer proinflammatorischen Aktivierungskaskade. Zudem ist die Aktivierung von Endothelzellen mit der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche des Gefäßendothels assoziiert. Dadurch wird das Eindringen weiterer Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf in das entzündete Gewebe vermittelt (Vassalli 1992).

Dem Einfluss und der Beteiligung sowie der regulatorischen Funktion von TNF- α bei Entzündungsreaktionen entsprechend wird TNF- α auch eine bedeutende Rolle bei den pathologischen Abläufen verschiedener entzündlicher Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, ankylosierende Spondylitis, Psoriasis oder Multiple Sklerose zugesprochen (Blam et al. 2001; Braun et al. 2008; Victor & Gottlieb 2002; Sharief & Hentges 1991). Bei Patienten mit einer rheumatischen Arthritis (RA) wurde festgestellt, dass mononukleare Zellen aus der synovialen Flüssigkeit sowie des synovialen Gewebes im Gegensatz zu den Zellen gesunder Kontrollpersonen TNF- α produzieren. Auch in der synovialen Flüssigkeit von entzündeten Gelenken konnte teilweise TNF- α detektiert werden (Yocum et al. 1989). Zudem spricht eine reduzierte Migration von Entzündungszellen in RA-Gelenke nach der systemischen Blockade von TNF- α für eine pathologische Rolle von TNF- α bei dieser chronischen Entzündungserkrankung (Taylor et al. 2000). Ein positiver Behandlungserfolg durch eine TNF- α -Inhibition bei RA-Patienten ist mehrfach aufgezeigt worden (Elliott et al. 1993; Elliott et al. 1994; Moreland et al. 1997; Maini et al. 1998). In verschiedenen klinischen Studien wurde auch eine Reduktion der pathologischen Symptome von aktiven, okulären Entzündungen autoimmunen oder idiopathischen Ursprungs nach einer systemischen anti-TNF- α -Therapie mit Infliximab, Etanercept oder Adalimumab beschrieben (Sfikakis et al. 2001; El-Shabrawi & Hermann 2002; Joseph et al 2003; Reiff et al. 2001; Biester et al. 2007; Rudwaleit et al. 2009; Mushtaq et al. 2007; Bawazeer et al. 2010; Ocul Immunol Inflamm 18 (3): 226). Eine Bedeutung von TNF- α bei autoimmuner Uveitis wurde durch verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen untermauert. TNF- α trägt neben der Aktivierung von Makrophagen und dem Antreiben der T-Zell-Effektorantwort durch das Dirigieren der Leukozyteninfiltration und als Reifungsfaktor für dendritische Zellen zur Pathogenese der EAU bei (Dick et al. 2004). Gerade die mit der Entzündungsreaktion einhergehende Schädigung okulärer Gewebe wird durch die Stickoxidproduktion von aktivierten Makrophagen vermittelt (Hoey et al 1997; Liversidge et al 2002). Im EAU-Modell konnte nach dem Ausschalten der TNF-Aktivität eine verringerte Aktivierung der einwandernden Makrophagen und eine damit verbundene reduzierte Stickoxidproduktion sowie geringere strukturelle Zerstörung von Netzhautgewebe beobachtet werden (Robertson et al. 2003).

Nicht nur in das Auge einwandernde Entzündungszellen, sondern auch ortständige Zellen des Auges wie Mikroglia-Zellen, RPE-Zellen und Müller-Zellen können TNF- α produzieren. Gerade bei inflammatorischen oder pathologischen Bedingungen war die TNF- α -Expression dieser Zellen erhöht (de Kozak et al. 1994; de Kozak et al. 1997; Rao et al. 2003). In einer klinischen Studie war der TNF- α -Gehalt in den okulären Flüssigkeiten von Uveitis-Patienten

mit einer aktiven Entzündung signifikant höher als bei Uveitis-Patienten, die seit mindestens sechs Monaten keine Entzündung mehr hatten (Sugita et al. 2007). Das spricht für eine bedeutende Beteiligung von intraokularem TNF- α an den Entzündungsprozessen im Zuge einer Uveitis, was TNF- α zu einem interessanten Zielmolekül für einen lokalen Behandlungsansatz macht.

1.7 Die TNF- α -inhibierenden Wirkstoffe

1.7.1 Etanercept

Die bei Uveitiserkrankungen in der Humanmedizin bereits eingesetzten TNF- α -Inhibitoren Infliximab, Adalimumab und Etanercept zählen zu der Substanzklasse der TNF- α -Antagonisten. Natürlich im Körper vorkommende TNF- α -Antagonisten stellen die löslichen Formen des TNF-R1 und des TNF-R2 dar, die von der membrangebundenen Form proteolytisch abgespalten werden können, ohne ihre TNF- α -bindenden Eigenschaften zu verlieren (Engelmann et al. 1989; Engelmann et al. 1990; Aderka et al. 1992b). Infliximab und Adalimumab sind monoklonale Antikörper, die spezifisch an TNF- α binden. Infliximab ist ein chimärer Antikörper, wobei die antigenbindenden, variablen Domänen der schweren und leichten Ketten von einem murinen Antikörper stammen und mit den konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten eines humanen Antikörpers verknüpft sind (Knight et al. 1993; Scallon et al. 2002). Adalimumab hingegen ist ein vollständig humanisierter Antikörper (Salfeld et al. 1998; van de Putte et al. 2003).

Etanercept ist ein rekombinantes dimeres Fusionsprotein, wobei an die kristallisierbaren, konstanten Domänen (Fc-Domäne) der schweren Ketten eines humanen Antikörpers (IgG1) jeweils die extrazelluläre ligandenbindende Domäne des humanen p75-TNF-Rezeptors geknüpft ist (Mohler et al. 1993; Scallon et al. 2002). Die Fusion des TNF-Rezeptors an die Fc-Domäne eines IgG1-Antikörpers verlängert die Halbwertszeit des Fusionsproteins, die bei der natürlichen löslichen Form des TNF-Rezeptors im Blutserum nur Sekunden bis Minuten beträgt (Mikuls & Moreland 2001). Die Halbwertszeit von subkutan injiziertem Etanercept hingegen beträgt bis zu über 100 Stunden (Zhou 2005; Heiligenhaus et al. 2010). Durch die dimere Struktur bindet Etanercept simultan an zwei der drei Bindungsstellen des trimeren TNF- α -Moleküls. Dadurch ist die Bindung im Vergleich zu der Bindung von TNF- α an einen monomeren löslichen TNF-Rezeptor verstärkt. Dennoch bindet ein Etanercept-Molekül auch nur ein TNF- α -Molekül (Ashkenazi et al. 1991; Mohler et al. 1993). Das an Etanercept gebundene TNF- α -Molekül kann nicht mehr an die membranständigen, spezifischen TNF-Rezeptoren der Zielzellen binden, wodurch die Signal- und Aktivierungskaskaden innerhalb

der Zielzellen und damit die Effekte von TNF- α unterbunden sind. Das Proteinkonstrukt Etanercept wird in einer Eierstockzelllinie (CHO-Zellen) des Chinesischen Hamsters exprimiert und anschließend aufgereinigt (Mohler et al. 1993; Scallon et al. 2002).

Aufgrund der guten klinischen Wirksamkeit und einer relativ guten Verträglichkeit ist Etanercept von der FDA (engl. food and drug administration) in den Vereinigten Staaten von Amerika und der EU-Kommission der Europäischen Gemeinschaft zur Behandlung rheumatischer Arthritis-Erkrankungen zugelassen worden (Mikuls & Moreland 2001). Neben der rheumatischen Arthritis bietet Etanercept auch bei weiteren, verschiedenen Entzündungskrankheiten mit autoimmuner oder endogener Ursache wie der ankylosierenden Spondylitis, der Psoriasis oder der psoriatischen Arthritis eine Behandlungsoption (Davis et al. 2003; Tying et al. 2007; Mease et al. 2000), und auch bei Patienten mit verschiedenen Uveitis-Formen fand die systemische Etanercept-Gabe bereits Anwendung (Theodossiadis et al. 2007). Die systemische Applikation von Etanercept verschaffte zudem eine Besserung beim Verlauf verschiedener experimenteller Krankheitsmodelle bei Mäusen (Bloquel et al. 2004; Hutchison et al. 2008; Shi et al. 2006).

1.7.2 Antisense-Oligonukleotide (ASON)

ASON sind einsträngige Desoxyribonukleotidketten aus etwa 13 bis 25 einzelnen Nukleotiden, mit deren Hilfe die Expression bestimmter Gene gezielt gehemmt werden kann. Dazu wird die Nukleotidsequenz der ASON so gestaltet, dass sie komplementär zu einem Abschnitt der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) des bestimmten Gens ist. Die von einer Zelle aufgenommenen ASON hybridisieren im Zytoplasma mit dem komplementären Abschnitt der bestimmten mRNA unter Bildung eines Doppelstranges, wodurch die Translation des Gens in das entsprechende Genprodukt unterbunden wird (Schlingensiepen et al. 1997). Bezüglich der Translationsblockade bestehen verschiedene Mechanismen. Ein möglicher Mechanismus ist die sterische Blockade des Ribosoms. Während der Translation bildet die mRNA Komplexe mit Ribosomen, die die mRNA abschreiten. Durch die Hybridisierung der mRNA mit einem ASON Strang ist das Weiterschreiten des Ribosoms an der Stelle des Doppelstranges blockiert. Zudem wird im Bereich des Doppelstranges die Wechselwirkung weiterer Translationsfaktoren mit der mRNA behindert. Gerade die Hybridisierung von ASON im Bereich des AUG-Initiationscodons oder angrenzend an die Kappe des 5'-Endes der mRNA, wodurch die Wechselwirkungen verschiedener Initiationsfaktoren mit der mRNA beeinflusst wird, zeigte eine effektivere Blockade der Translation (Boiziau et al. 1991). Ein weiterer Mechanismus der Translationsblockade ist die Degradierung des hybridisierten

Doppelstranges aus mRNA und ASON durch RNase H. Die RNase H ist ein Enzym, das spezifisch den RNA-Strang eines RNA-DNA-Doppelstranges hydrolytisch spaltet. Durch die RNase H katalysierte Spaltung der Phosphodiester-Bindung benachbarter Nukleotide entstehen Nukleotide mit einer 3'-OH-Gruppe und Nukleotide mit einer 5'-Phosphat-Gruppe als Endprodukte. Bei einem RNase H abhängigen Mechanismus wird die Proteinsynthese nicht nur blockiert, sondern die Informationsgrundlage in Form der mRNA irreversibel zerlegt (Wintersberger 1990). Es bestehen auch Wirkmechanismen, die auf einer früheren Ebene ansetzen. Dabei treten ASON innerhalb des Zellkernes mit dem primären Transkriptionsprodukt (prä-mRNA) in Wechselwirkung und nehmen Einfluss auf das Herausschneiden von Intronsequenzen (Spleißen) oder die Prozessierung der prä-mRNA. Dadurch wird die Entstehung einer reifen mRNA, die zur Proteinbiosynthese in das Zytoplasma transportiert werden kann, verhindert (Kim & World 1985; Kulka et al. 1989; Schlingensiepen et al. 1997).

Ein kritischer Punkt bei der Anwendung von ASON in der gezielten Modulation der Expression von Genen ist die Aufnahme von ASON in die Zelle sowie die Stabilität der ASON. In diesem Zusammenhang spielen chemische Modifikationen der ASON-Moleküle eine wichtige Rolle. Nicht modifizierte ASON werden in den biologischen Flüssigkeiten rasch durch Exo- und Endonukleasen degradiert (Kurreck 2003). Bei phosphorothioierten ASON ist ein freies Sauerstoffatom der Phosphodiesterbrücke durch ein Schwefelatom ersetzt. Diese Modifikation bildet ASON der sogenannten ersten Generation, die wichtige Eigenschaften für ASON-typische Wirkmechanismen, wie die Bildung eines stabilen Doppelstranges über Watson-Crick Basenpaarungen, die Funktion als RNase H Substrat und eine gute Aufnahme in Zellen, mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der hydrolytischen Spaltung durch Nukleasen kombinieren (Eckstein 2000). Ein Nachteil phosphorothioierter ASON ist ihre von der Sequenz unabhängige verstärkte Wechselwirkung mit Proteinen, wovon toxische Effekte ausgehen können (Brown et al. 1994; Levin et al. 1999). Bei Oligonukleotiden der zweiten Generation sind die mit phosphorothioierten ASON verbundenen Toxizitätsprobleme teilweise verringert. Bei diesen Oligonukleotiden ist die Hydroxylgruppe an der 2'-Position der Ribose durch eine 2'-O-Methyl- oder eine 2'-O-Methoxyethyl-Gruppe substituiert. Im Gegensatz zu phosphorothioierten ASON können 2'-O-Methyl- oder eine 2'-O-Methoxyethyl RNA nicht durch RNase H gespalten werden (Kurreck 2003). Weitere chemische Modifikationen stellen Methylphosphonate, N3'-P5'-Phosphoroamidate, Morpholino Phosphoroamidate, Peptid-Nukleinsäuren (PNA), 2'-fluoro-arabino Nukleinsäuren (FANA), geschlossene Nukleinsäuren (LNA), Cyclohexen-

Nukleinsäuren (CeNA) und Tricyclo-DNA dar. Bei diesen Oligonukleotiden der dritten Generation sind neue chemische Modifikationen der Phosphatbrücken des Phosphodiester-Rückgrades oder der Ribose oder sogar gänzliche Substitutionen dieser Molekülbestandteile entwickelt worden, um die Affinität an die Ziel-mRNA, die Stabilität des entstandenen Doppelstranges und die Stabilität gegenüber dem Abbau durch Nukleasen zu erhöhen. (Dias & Stein 2002; Kurreck et al. 2003). Manche dieser neu entwickelten Oligonukleotide der dritten Generation treten mit ein- oder doppelsträngiger DNA in Wechselwirkung und können damit die Aktivität der RNA-Polymerase oder Bindung von Transkriptionsfaktoren blockieren, was die Genexpression bereits auf der Ebene der Transkription hemmt (Boffa et al 1996; Hanvey et al. 1992; Vickers et al. 1995; Gryaznov et al. 1995). Bei der Entwicklung von ASON ist neben der chemischen Modifikation darauf zu achten, dass Homologien zu anderen mRNA-Molekülen als der spezifischen Ziel-mRNA (Kurreck et al. 2003) sowie das Vorkommen von immunstimulatorischen CpG-Motiven oder palindromen Sequenzen vermieden werden. Zudem sollten ASON keine Abfolgen von vier benachbarten Guanin-Basen enthalten, da diese durch die Ausbildung von Hoogsteen Basenpaarungen viersträngige Strukturen (G4-DNA) mit verschiedenen sequenzunabhängigen Effekten ausprägen können (Sen & Gilbert 1992; Krieg et al. 1995; Stein 2001).

Die chemische Modifikation von ASON beeinflusst nicht nur deren Wirkmechanismus und Stabilität, sondern auch die Aufnahme in eine Zelle. Die Aufnahme von Oligonukleotiden in das Innere einer Zelle erfolgt über Endozytose. Bei negativ geladenen Oligonukleotiden wie nicht modifizierten oder phosphorothioierten ASON wird die Endozytose über die Bindung an einen Rezeptor vermittelt. Bei der adsorptiven Endozytose kommt es zu einer unspezifischen Bindung des Moleküls an die Zelloberfläche. Auch die Endozytose von Molekülen in der flüssigen Phase ist möglich. Die beiden letzteren Mechanismen werden für die Aufnahme von Methylphosphonaten angenommen (Loke et al. 1989; Yakubov et al. 1989; Stein et al. 1988; Shoji et al. 1991; Akhtar & Juliano 1992).

Der therapeutische Einsatz von ASON geht auf die Entdeckung zurück, dass die Replikation von Rous-Sarkom-Viren (RSV) in infizierten und kultivierten Hühnerembryo Fibroblasten durch die Zugabe von Oligodeoxynukleotiden, die komplementär zu einem Abschnitt der RSV-mRNA waren, gehemmt werden konnte (Zamecnik & Stephenson 1978). So ist auch das erste zugelassene Medikament in Form von Antisense-Oligonukleotiden (Fomivirsen) ein antiviraler Wirkstoff. Fomivirsen (Vitravene®) ist ein synthetisches phosphorothioiertes ASON, das komplementär zu der „major immediate early region“ (IE2) Protein-kodierenden mRNA des Cytomegalievirus (CMV) ist. Durch die Hybridisierung mit der Zielsequenz wird

die Produktion von für das Virus essentiellen Proteinen gehemmt. Vitravene® wurde im Jahr 1998 für die intravitreale Behandlung der CMV-induzierten Retinitis bei AIDS-Patienten von der FDA der Vereinigten Staaten von Amerika zugelassen. In Europa erfolgte die Genehmigung von Vitravene® durch die EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) im Jahr 1999 sowohl für neu aufgetretene als auch bereits diagnostizierte Fälle von CMV-induzierter Retinitis (Azad et al. 1993; The Vitravene study group 2002). Die Möglichkeit der Entwicklung von ASON, die gezielt die Expression von spezifischen in der Entstehung von Erkrankungen involvierten Faktoren hemmen, machen diese Wirkstoffklasse auch für den Einsatz bei verschiedenen Krebs-, Stoffwechsel und Autoimmunerkrankungen interessant. Dementsprechend ist die Anwendung von ASON in klinischen und experimentellen Studien zur Behandlung von Tumoren, Diabetes und verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Colitis ulcerosa oder Multiple Sklerose beschrieben (Wacheck 2006).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Mit einer Inzidenz von etwa 50/100.000 ist die endogene Uveitis eine relativ verbreitete Erkrankung in der westlichen Welt und ist für einen bedeutenden Anteil schwerer Beeinträchtigungen des Sehvermögens verantwortlich. Bis heute erfolgt die Therapie autoimmuner posteriorer Uveitiden durch die systemische oder topische Gabe von unspezifisch wirksamen Kortikosteroiden und Immunsuppressiva. Da diese Therapien nicht selten mit schweren Nebenwirkungen verbunden sind, besteht ein neuerer Behandlungsansatz in der zusätzlichen systemischen Applikation von spezifisch wirksamen Biologika bei gleichzeitiger Reduktion der breit wirkenden Substanzen. Da TNF- α eine entscheidende Bedeutung beim Ablauf pathologischer Entzündungsprozesse zugesprochen wird, finden bei Uveitispatienten unter anderem TNF- α -Antagonisten als Biologika Anwendung. Doch auch die systemische Inhibition von TNF- α kann mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sein, wie ein erhöhtes Risiko viraler und bakterieller Infektionen oder dem Ausbruch einer latenten Tuberkulose (Curtis et al. 2007; Keane et al. 2001). Auch ein erhöhtes Auftreten von Lymphomen wird diskutiert (Nair et al. 2007; Geborek et al. 2005; Brown et al. 2002). Das Ziel gegenwärtiger Forschung ist es daher, lokale Behandlungsansätze zu etablieren, die an dem Ort der Entzündung wirksam sind und unerwünschte systemische Nebenwirkungen reduzieren.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit eine lokale TNF- α -Inhibition durch Etanercept den Schweregrad der durch aktive Immunisierung induzierten EAU als Modell für

die humane posteriore Uveitis beeinflussen kann. Dabei sollen verschiedene Applikationsarten in Form subkonjunktivaler und intravitrealer Injektionsarten für die lokale Gabe des Wirkstoffes etabliert sowie verschiedene Zeitpunkte der Behandlung nach der Auslösung des Modells untersucht werden. Die Stärke und Ausprägung der EAU sollen anschließend durch klinische und histopathologische Untersuchung der Augen überprüft werden. Zudem sollen immunologische Funktionstests Aufschluss über modulierende Einflüsse von lokal appliziertem Etanercept auf die Immunantwort und dessen Wirkmechanismen geben. In diesem Zusammenhang soll die Fähigkeit zur Proliferation und Zytokinproduktion isolierter Zellen aus der Milz und regionalen Lymphknoten nach antigen-spezifischer Stimulation sowie der Zytokingehalt in den okulären Geweben nach der Etanercept-Applikation untersucht werden. Die Effekte der lokalen Gabe von Etanercept sollen mit denen der systemischen Gabe verglichen werden.

Zudem soll untersucht werden, inwieweit die intraokulare TNF- α -Inhibition durch Etanercept eine Beeinträchtigung des Immunprivileges des Auges darstellen kann. Dabei soll nach Auslösung einer Glaskörperraum-assoziierten Immundeviation der Einfluss einer intravitrealen Etanercept-Injektion auf die Ausbildung einer DTH-Reaktion untersucht werden.

Weitergehend soll der Effekt von Etanercept auch auf die EAU-Induktion durch adoptiven Transfer untersucht werden.

Als eine Wirkstoffkontrolle zu Etanercept soll der Effekt von an die mRNA von TNF- α bindenden ASON nach lokaler Applikation im EAU-Modell untersucht werden. Die Injektion von FITC-markierten Kontrolloligonukleotiden soll Aufschluss über die Aufnahme des Wirkstoffes in Zellen, die Verteilung des Wirkstoffes in den okulären Geweben und die Kinetik des Wirkstoffes nach den verschiedenen lokalen Applikationsmethoden geben.

Zusammengefasst soll die Möglichkeit eines Behandlungsansatzes durch die lokale TNF- α -Inhibition bei experimenteller autoimmuner Uveoretinitis untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton
 Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)
 3-Aminoethyl-9-carbazol (AEC)
 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)
 Ammoniumchlorid (NH₄Cl)
 Ammoniumpersulfat
 Aquatex
 Bläuenlösung (Bluing Reagent)
 Brefeldin A
 Bromphenolblau
 Ciprofloxacin
 (Infusionslösung, 200 mg / 100 ml)
 N, N-Dimethylformamid

 Dimethylsulfoxid
 di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
 DTT (1,4-Dithiothreitol)
 EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
 Entwickler für Röntgenfilm
 (Kodak GBX developer/replenisher)
 Eosin Y (alkoholische Lösung)
 Essigsäure (100 %)
 Ethanol (99,8 %, vergällt)
 Eukitt®
 Ficoll-Paque™ PLUS
 Fixierer für Röntgenfilm
 (Kodak GBX fixer/replenisher)
 Formaldehydlösung (37 %)
 Gelatine
 Glycerin
 Glycin
 Hämatoxylin (Gill No. 3)
 Hämatoxylin (Instant Komponente A + B)
 HEPES
 Isopropanol (2-Propanol, 99,5 %)
 2-Mercaptoethanol
 Methanol (99,9 %)

Hersteller, Standort

Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 Merck KGaA, Darmstadt
 Shandon, Inc., Pittsburgh, USA
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Fresenius Kabi Deutschland GmbH,
 Bad Homburg
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
 Merck KGaA, Darmstadt
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

 Carestream Health Inc., Rochester, USA
 Shandon, Inc., Pittsburgh, USA
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 O. Kindler GmbH, Freiburg
 Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

 Carestream Health Inc., Rochester, USA
 Merck KGaA, Darmstadt
 Merck KGaA, Darmstadt
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
 Shandon, Inc., Pittsburgh, USA
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
 Merck KGaA, Darmstadt
 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumhydroxid (NaOH , Feststoff)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Paraffin (Paraplast® PLUS)	Leica Microsystems GmbH, Peterborough, UK
PBS (Dulbecco's)	Biochrom AG, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure (HCl , 4M, 6M, rauchend 37 %)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Schwefelsäure (H_2SO_4 , 95 %)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat) Ultra pure	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Super Signal® (West Pico Chemiluminescent)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Szintillationsflüssigkeit (Betaplate Scint)	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin 3, 3', 5, 5'	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
[^3H] Thymidin	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Titriplex III (Natrium EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
TWEEN® 20	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30 %)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Zitronensäure	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

2.1.2 Antikörper und Biochemikalien

2.1.2.1 Primärantikörper

Tabelle X: In Durchflusszytometrie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz eingesetzte Primärantikörper gegen Maus-Antigene

Antigen	Donor	Konjugat	Klon	Hersteller, Standort
CD4		FITC	RM4-5	eBioscience, Frankfurt a. M.
F4/80	Ratte	Alexa Fluor® 647	CI:A3-1	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf
CD16/CD32	Ratte	unkonjugiert	2.4G2	BD Fc Block™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
GFAP	Kaninchen	unkonjugiert	polyklonal	DakoCytomation GmbH, Hamburg
TNF- α	Kaninchen	unkonjugiert	polyklonal	Abcam plc, Cambridge, UK
TNF- α	Ratte	PE	MP6-XT22	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
β -Aktin	Kaninchen	unkonjugiert	polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Färbungen sowie im Western Blot wurden Biotin-konjugierte, polyklonale Antikörper (F(ab')₂) aus dem Schwein gegen Kaninchen-Immunglobuline (DakoCytomation GmbH, Hamburg) eingesetzt.

2.1.2.3 Biochemikalien

	Hersteller, Standort
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
CFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Concanavalin A (Con A)	Biochrom AG, Berlin
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt
IFN- γ (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
LPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
IRBPp161-180	EMC microcollections GmbH, Tübingen
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinmarker (gefärbt, für Western Blot) (Prestained SDS-PAGE Standards)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PTX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Streptavidin-HRP	DakoCytomation GmbH, Hamburg/ BioLegend GmbH, Fell
Streptavidin-PE	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
TNF- α (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

2.1.3 Wirkstoffe und Arzneimittel

ASON	Hersteller, Standort Biognostik GmbH, Göttingen
Etanercept (Enbrel®)	Wyeth Pharmaceuticals, Hampshire, UK
Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel® 2%)	OmniVision® AG, Neuhausen, Schweiz)
Ketamin 10 %	Ceva Deutschland GmbH, Düsseldorf
Kontrolloligonukleotide	Biognostik GmbH, Göttingen
Kontrolloligonukleotide (FITC-markiert)	Biognostik GmbH, Göttingen
Proxymetacain ((Proparacain-POS® 0,5 %)	Ursapharm Arzneimittel GmbH, Saarbrücken
Tropicamid (Mydriaticum Stulln Vidisic®)	Pharma Stulln GmbH, Stulln
Xylazin 2 %	Bausch & Lomb, Berlin Ceva Deutschland GmbH, Düsseldorf

2.1.4 Seren

Fötales Kälberserum (FCS)	Hersteller, Standort Biochrom AG, Berlin/ PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Normales Mausserum	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Normales Schweineserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

2.1.5 Kits

Maus Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex Kit (Bead Assay)	Hersteller, Ort Bender MedSystems (eBioscience), Wien, Österreich
OptEIA™ Maus IFN- γ ELISA Kit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA™ Maus IL-2 ELISA Kit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA™ Maus IL-4 ELISA Kit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA™ Maus IL-6 ELISA Kit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA™ Maus IL-10 ELISA Kit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA™ Maus IL-12 (p70) ELISA Kit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
OptEIA™ Maus TNF- α ELISA Kit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Proteintest	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Quantikine Maus IL-17 ELISA Kit

R&D Systems GmbH, Wiesbaden

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen (24 x 50 mm)

Deckelstrips (für Greiner-Röhrchen)

Einwegspritze (1 ml und 10 ml)

Eppendorf-Gefäß (1,5 ml und 2 ml)

Filterpapier

Filtermatten (96 Felder, Filtermat A, GF/C)

Glaskapillaren (GB100F-8P)

Greiner-Röhrchen

(PP-Röhrchen 1,3 ml)

Kanüle (20G, 23G, 27G)

Kanüle (30G)

Kanüle (33G)

(Nadel RN 33/51/pst4)

Kryoröhrchen (2 ml)

Mikrotomklingen (R 35)

Nunc-Immuno™ Platte für ELISA
(F96 Maxisorp)

Objektträger

Pipettenspitze (1000 µl, 200 µl, 20 µl)

Probenbeutel (für Filtermatte)

PVDF-Membran

(Amersham Hybond-P; 0,45 µm)

50 ml und 15 ml Röhrchen

Röntgenfilm (Kodak BioMax XAR Film)

Sterilfilter (Rotilabo®-Spritzenfilter)

Sterilfilter (VacuCap® 90)

Zellkulturflasche (75 cm²)

Zellkulturplatte Flachboden
(12 Felder)

Zellkulturplatte Flachboden
(24 und 96 Felder)

Zellkulturplatte Rundboden (96 Felder)

Zellkulturschale

Zellkulturschale (Fisherbrand®, Polystyren,
für Knochenmarksmakrophagen)

Hersteller, Ort

VWR International GmbH, Darmstadt

Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien

Sarstedt AG und Co., Nümbrecht

Sartorius AG, Göttingen

PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau

Science products GmbH, Hofheim

Greiner Bio-One GmbH, Solingen-Wald

Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

TPP Techno Plastic Products AG,
Trasadingen, Schweiz

Feather Safety Razor Co., LTD,
Osaka, Japan

Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig

Sarstedt AG und Co., Nümbrecht

PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau

GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire,
UK

Sarstedt AG und Co., Nümbrecht

Carestream Health Inc., Rochester, USA

Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

Pall GmbH, Dreieich

TPP Techno Plastic Products AG,
Trasadingen, Schweiz

SPL Lifesciences Co. Ltd, Pocheon-Si,
Korea

TPP Techno Plastic Products AG,
Trasadingen, Schweiz

TPP Techno Plastic Products AG,
Trasadingen, Schweiz

TPP Techno Plastic Products AG,
Trasadingen, Schweiz

Fisher Scientific Co LLC, Suwanee, USA

Zellschaber (BD Falcon™)

BD Biosciences, Erembodegem, Belgien

2.1.7 Sonstiges Material

Blotmodul (Mini Trans-Blot cell / Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis system)

Hersteller, Standort

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Einkanalpipette

(Eppendorf Reference®/Research®, 0,5-10 µl / 10-100 µl / 100-1000 µl)

Eppendorf AG, Hamburg

Elektrophoreseeinheit (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis system)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Gel-Gussstation

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Gewebehomogenisator (Glas)

VWR International GmbH, Darmstadt

Mehrkanalpipette (Eppendorf Research®)

Eppendorf AG, Hamburg

Messpipette (AS, Typ 3)

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt

Mikroliterspritze (100 µl, 1710 LT)

Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

Mikroliterspritze (10 µl, 701 RN)

Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

Mikrometer (Digitale Schieblehre DMV-SL05)

Import-Electronic-Service GmbH, Hamburg

Zählkammer nach Neubauer

Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen

2.1.8 Geräte

Achtkanal-Photometer (MRX)

Hersteller, Standort

Dynatech Laboratories GmbH, Denkendorf

Dampfsterilisator (Varioklav®)

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim

Durchflusszytometer (FACSCalibur)

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Elektrophoresestrom/Spannungs-Anschlussgerät (PowerPac 300)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Filtermatten-Harvester

(MicroBeta FilterMate-96) Harvester

PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau

Flüssigszintillationszähler (β-Counter) (Wallac 1450 Microbeta Plus)

Wallac Oy, Turku, Finnland

Folienschweißgerät (Folio)

Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern

Inkubator (Hera cell)

Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

Invertmikroskop (Olympus CK 40-F200)

Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japan

Lichtmikroskop/Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 40)

Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japan

Operationsmikroskop (Zeiss OPMI 19)

Carl Zeiss Meditec AG, Jena

Paraffinstreckbad

GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Paraffinstrecktisch (PST 100)

H. Jürgens & Co.-GmbH & Co., Bremen

pH/mV Taschenmessgerät (pH 330/SET)	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Pipettierhilfe (BD Falcon™ Express™)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Reinstwassersystem (für A. dest.) (EASYPure™ UF)	Wilhelm Werner GmbH, Leverkusen
Rotationsmikrotom (Leica RM 2135)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Sterilwerkbank (Hera safe)	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Tischzentrifuge (Heraeus Pico 17)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls HD 2200)	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin
Vorschaltgerät für Quecksilberbrenner (U-RFL-T, für Fluoreszenzmikroskop)	Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japan
Waage (Ohaus Explorer®)	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Wärmeschrank (Mettler ULM 400)	Mettler GmbH + Co.KG, Schwabach
Vortex Schüttelgerät	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Zentrifuge (Multifuge 3 S-R+)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte

2.1.9 Puffer und Lösungen

2.1.9.1 Puffer und Lösungen für Injektionszwecke

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

9,55 g PBS ad 1 l A. dest.

Lagerung nach Sterilfiltration bei Raumtemperatur.

Tris-EDTA (TE)-Puffer

1,2114 g Tris (10 mM)

0,29224 g EDTA (1 mM)

ad 1 l A. dest.

Lagerung nach Sterilfiltration bei Raumtemperatur.

2.1.9.2 Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie

Fixierlösung zur Fixierung von Augengewebe

80 % Isopropanol, 37 % Formaldehydlösung und 25 % Essigsäure wurden im Verhältnis 8:1:1 (v/v/v) gemischt.

Hämatoxylin für H&E-Übersichtsfärbung

Eine Packung Instant-Hämatoxylin Komponente A und eine Packung Instant-Hämatoxylin Komponente B ad 1 l A. dest.

Lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur.

Vor Gebrauch filtriert.

PBS^S

1 % FCS in PBS (v/v).

Proteinase K Lösung für Antigenretrieval

20 µg Proteinase K
6,1 g Tris (50 mM)
0,37 g EDTA (1 mM)
Ad 1 l A. dest.
pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Acetatpuffer (pH5; Walpole)

Lösung A: 8,2 g Natriumacetat ad 1 l A. dest.
Lösung B: 0,1 M Essigsäure (5,8 ml Essigsäure [100 %] mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen).
141 ml von Lösung A mit 59 ml von Lösung B mischen.

Eindeckmedium für die Fluoreszenzmikroskopie

5 ml Glycerin
5 ml 10 fach konzentriertes PBS
40 ml A.dest

2.1.9.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Hämolyspuffer

8,29 g Ammoniumchlorid (NH₄Cl)
0,037 g Titriplex
0,839 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)
Ad 1 l A. dest.
Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt.
Lagerung nach Sterilfiltration bei Raumtemperatur.

Hepes/Mercaptoethanol

10 ml A. dest.
10 µl 2-Mercaptoethanol
12,5 ml 1 M HEPES
Lagerung nach Sterilfiltration bei -20 °C.

RPMI

10,43 g RPMI 1640
2 g NaHCO₃
ad 1 l A. dest.
pH-Wert mit HCl auf 7,3 eingestellt.
Lagerung nach Sterilfiltration bei 4 °C.

Lymphozytenmedium

10 % FCS (v/v), 2 % Hepes/Mercaptoethanol (v/v), 1 % Ciprofloxacin (v/v) in RPMI.
Lagerung nach Sterilfiltration bei 4 °C.

Medium für L929-Zellen

10 % FCS (v/v), 1 % Ciprofloxacin (v/v) in RPMI.

2.1.9.4 Puffer und Lösungen für den Enzym-gekoppelten Immunadsorbtionstest

(ELISA, engl. enzyme linked immunosorbent assay)

Beschichtungspuffer für ELISA (pH-Wert 6,5)

18,5 g Natriumhydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)

11,8 g di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

ad 1 l A. dest.

pH-Wert mit NaOH auf 6,5 eingestellt.

Lagerung bei 4 °C.

Beschichtungspuffer für ELISA (pH-Wert 9,5)

7,13 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

1,59 g Natriumcarbonat Na_2CO_3

ad 1 l A. dest.

pH-Wert mit NaOH auf 9,5 eingestellt.

Lagerung bei 4 °C.

Substratpuffer für ELISA

20,2 g Zitronensäure

8,2 g Natriumacetat

ad 1 l A. dest.

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 eingestellt.

Lagerung bei 4 °C.

Verdünnungslösung für ELISA

10 % FCS in PBS (v/v).

Waschpuffer für ELISA

0,05 % TWEEN®-20 in PBS (v/v).

2.1.9.5 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Fixierlösung zur Fixierung von Zellen (gepufferte Formaldehydlösung)

4 % Formaldehyd in PBS.

Saponinpuffer

Für 10 fach konzentrierten Saponinpuffer: 0,75 g Saponin ad 15 ml A. dest.

Für einfach konzentrierten Saponinpuffer: 10 fach konzentrierter Saponinpuffer 1:10 verdünnt in PBS mit 2 % FCS.

2.1.9.6. Puffer und Lösungen für den Western Blot

Tris-Puffer (pH 8,8)

27,23 g Tris ad 150 ml A. dest.

pH-Wert mit HCl (6 M) auf 8,8 eingestellt.

Tris-Puffer (pH 6,8)

6 g Tris ad 100 ml A. dest.

pH-Wert mit HCl (6 M) auf 6,8 eingestellt

Elektrophoresepuffer (10 fach konzentrierte Stocklösung)

30,2 g Tris
188 g Glycin
10 g SDS
ad 1 l A. dest.
vor Gebrauch 1 :10 mit A. dest. verdünnt

Ladepuffer

7 ml Tris-Puffer (pH 6,8)
3 ml Glyzerin
1 g SDS
0,93 g DTT
Bromphenolblau (1,2 mg oder wenige Körner bis gewünschte Farbtintensität)

Sammelgel

2,75 ml A. dest.
840 µl Acrylamid
1,3 ml Tris-Puffer (pH 6,8)
50 µl 10 % SDS-Lösung (10 g SDS ad 100 ml A. dest.)
50 µl 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (10 g Ammoniumpersulfat ad 100 ml A. dest.)
5 µl TEMED

Transferpuffer

3,03 g Tris
14,4 g Glycin
200 ml Methanol
ad 1 l A. dest.

Trenngel (15 % Acrylamid-Gel)

3,4 ml A. dest.
7,5 ml Acrylamid
3,8 ml Tris-Puffer (pH 8,8)
150 µl 10 % SDS-Lösung
150 µl 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung
6 µl TEMED

Tris gepufferte Salzlösung (TBS) (10 fach konzentrierte Stocklösung)

60,55 g Tris
80,02 g Natriumchlorid (NaCl)
ad 1 l A. dest.
pH-Wert mit HCl (6 M) auf 7,6 eingestellt.
Vor Gebrauch 1:10 mit A. dest. verdünnt.

Waschpuffer (TBS-T)

0,05 % TWEEN®-20 in TBS (v/v).

2.2 Methoden

2.2.1 TNF- α -Bioassay

Die Untersuchung, inwieweit der in den Tierexperimenten eingesetzte humanisierte Wirkstoff Etanercept die biologische Aktivität auch von murinem TNF- α blockieren kann, erfolgte *in vitro* durch einen Bioassay an L929-Zellen. TNF- α induziert den programmierten Zelltod (Apoptose) in dieser murinen Fibroblasten-Tumorzelllinie. In FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v) bei -80 °C gelagerte L929-Zellen wurden nach dem Auftauen bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und anschließend in Medium für L929-Zellen (RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 1% Ciprofloxacin) aufgenommen und resuspendiert. Es wurden 10 ml der Zellsuspension auf eine Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für mehrere Tage bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt. Nachdem die adhärenenten Zellen einen dichten Zellrasen gebildet hatten, wurde das Medium von der Zellkulturschale abgenommen und die Zellen mit Hilfe einer Messpipette und kühlem PBS von der Zellkulturschale abgelöst. Nach einmaligem Waschen der Zellen in PBS wurden sie mit Medium für L929-Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μ l in jede Vertiefung einer 96-Felderplatte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium für L929-Zellen durch 100 μ l RPMI 1640 ersetzt. In einem ersten Schritt wurden 100 μ l eines Standard-Proteins von rekombinantem TNF- α zu den Vertiefungen der 96-Felderplatte gegeben, sodass die Endkonzentration von TNF- α 55 Einheiten pro ml (U/ml) betrug. Nach einer Durchmischung des Inhaltes einer Vertiefung wurden 100 μ l des Volumens wieder abgenommen und verworfen. In die Hälfte der Vertiefungen wurden zusätzlich zu dem TNF- α -Standard 50 μ g Etanercept in einem 2 μ l Volumen ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurden in jede Vertiefung 100 μ l einer 1:250 Verdünnung von Actinomycin D gegeben, was eine stärkere Sensitivität des Bioassays bewirkt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden erfolgte die visuelle Auswertung des Testes mit Hilfe eines Invertmikroskopes, wobei das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen in einer Vertiefung abgeschätzt wurde. Als Kontrollen wurden auf der 96-Felderplatte Ansätze mitgeführt, wo die Zellen ohne TNF- α , Etanercept und Actinomycin D oder ohne TNF- α und Etanercept, aber mit Actinomycin D inkubiert wurden.

In einem zweiten Schritt wurde eine Titration der Menge an Etanercept durchgeführt, die die biologische Aktivität einer bestimmten TNF- α -Konzentration hemmen kann. Dazu wurde in den Spalten der 96-Felderplatte von oben nach unten eine serielle Verdünnungsreihe des

TNF- α -Standards in Verdünnungsschritten von 1:2 aufgetragen. In die Vertiefungen einer Reihe einer 96-Feldertafel wurde von links nach rechts in absteigender Konzentration 1 μ l einer seriellen Verdünnung der Etanercept-Lösung gegeben.

2.2.2 Versuchstiere

Für die durchgeführten Untersuchungen am EAU-Modell wurden Mäuse vom Stamm B10.RIII eingesetzt. Dieser Mausstamm zeichnet sich durch den suszeptiblen H-2 Haplotyp H2^r aus. Nach bisherigem Kenntnisstand zeigt der B10.RIII-Stamm die höchste Suszeptibilität für eine EAU (Agarwal & Caspi 2004).

Es wurden einmalig B10.RIII-Mäuse von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Ausgehend von dieser Population wurde eine Zucht in den Räumlichkeiten von Covance Laboratories GmbH (Münster) aufgebaut. Da es sich bei B10.RIII-Mäusen um einen Inzuchtstamm handelt, wurden für die Erstellung von Zuchtpaaren Geschwistertiere zusammengesetzt. Jungtiere wurden im Alter von drei Wochen von den Elterntieren getrennt nach Männchen und Weibchen abgesetzt.

Zur Durchführung der Tierversuche wurden Mäuse beider Geschlechter im Alter von minimal vier Wochen bis hin zu einigen Monaten verwendet. Es ist beschrieben, dass Alter und Geschlecht keinen Einfluss auf die Suszeptibilität für diese Erkrankung haben (Agarwal & Caspi 2004). Die Tierversuche wurden in den Räumlichkeiten der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Münster durchgeführt. Nach dem Transport der Tiere in die ZTE wurde vor Beginn der Experimente eine Adaptionszeit von mindestens einer Woche gewährt. In der ZTE waren die Tiere in einer konventionellen, offenen Haltung in Typ-2-Käfigen (36,5 x 20,5 cm) untergebracht. In dem Haltungsraum der ZTE wurden die Mäuse bei einem Hell-Dunkelrhythmus von je 12 Stunden und Zugang zu Futter (JL Ratte und Maus/Auto 6F 5K52, PMI LabDiet®, Richmond, USA) und Trinkwasser *ad libitum* gehalten. Alle Eingriffe und Behandlungen der Tiere wurden in einem vom Haltungsraum separierten Operationslabor vorgenommen.

2.2.3 Behandlungen der Versuchstiere

2.2.3.1 EAU-Induktion durch aktive Immunisierung

Die Mäuse wurden mit Peptiden, deren Sequenz (SGIPYIISYLHPGNTILHVD) den Aminosäuren 161-180 des humanen IRBP (IRBPp161-180) entsprechen, immunisiert. Zur Anfertigung einer IRBPp161-180-Stocklösung wurden 100 mg des Peptids in 50 ml A. dest. gelöst und bis zur Verwendung in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert. Den Tieren wurden 100

µg IRBPp161-180 in einer Emulsion, die zu gleichen Volumenanteilen aus IRBPp161-180-Lösung (50 µl IRBPp161-180 Stocklösung zuzüglich 50 µl PBS) und CFA bestand, verabreicht. Pro Maus wurde ein Gesamtvolumen von 200 µl dieser Emulsion an drei verschiedenen Stellen subkutan injiziert. Eine 23-G-Kanüle wurde von der Basis der Schwanzwurzel an unter der Haut parallel zur Wirbelsäule entlang geführt. Dort im Bereich des Rückens wurde eine Portion von 100 µl der Emulsion injiziert. Zwei weitere Portionen von je 50 µl wurden an den Flanken im Bereich der Leisten subkutan injiziert. Als zusätzliches Adjuvans wurde PTX eingesetzt. Pro Maus wurden 0,4 bis 0,5 µg PTX in einem 100 µl Volumen (PBS) intraperitoneal appliziert. Damit waren die Dosierungen an gängige, in der Literatur beschriebene Immunisierungsschemata angelehnt (Jiang et al. 1999; Xu et al. 2004; Amadi-Obi et al. 2007).

2.2.3.2 Narkose der Versuchstiere

Für die Durchführung intravitrealer und subkonjunktivaler Wirkstoffapplikationen wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Xylazin-Narkose anästhesiert. Dabei wurden zu 5 ml PBS 1 ml 10 % Ketamin und 250 µl 2 % Xylazin gegeben. Von dieser Mischung wurden 110-250 µl für eine 20 g - 40 g schwere Maus intraperitoneal injiziert (d.h. 88-200 µg Xylazin und 1,76 mg - 4 mg Ketamin pro Maus). Vor der Narkose wurden die Mäuse gewogen. Um ein Auskühlen des Körpers zu verhindern, wurden die Mäuse nach der Behandlung bis zum Erwachen aus der Narkose unter eine Rotlicht-Wärmelampe gelegt. Zum Schutz vor Austrocknung wurde jeweils ein Tropfen eines Feuchtigkeit spendenden Gels (Vidisic®) auf die Augen gegeben.

2.2.3.3 Systemische Applikation von Etanercept

Das Etanercept wurde gemäß den Angaben des Herstellers in Wasser für Injektionszwecke gelöst. Bis zur Verwendung wurde die Stocklösung (25 mg/ml) in 100 µl Aliquots bei -20 °C gelagert. Zur systemischen Behandlung der Mäuse wurden 200 µg Etanercept in einem Volumen von 200 µl intraperitoneal injiziert. Die systemische Behandlung erfolgte prophylaktisch in der afferenten Phase des Modells an den Tagen -1, 1, 3 und 5 oder therapeutisch in der efferenten Phase des Modells an den Tagen 6, 9 und 12 nach der aktiven Immunisierung (Tabelle 1; siehe S. 52). Kontrolltieren wurden 200 µl PBS intraperitoneal injiziert.

2.2.3.4 Subkonjunktivale Applikation von Etanercept

Für die Durchführung der subkonjunktivalen Injektionen wurden die Mäuse narkotisiert. Mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand wurde der Kopf der Maus fixiert. Die subkonjunktivale Injektion erfolgte mit einer Mikroliterspritze (1710 LT, siehe 2.1.7) und einer 30-G-Kanüle. Unter der Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops wurde die Kanüle unter die Bindehaut des rechten Auges geführt und ein Volumen von 30 µl injiziert. Dabei wurden wie bei der systemischen Gabe auch 200 µg Etanercept appliziert. Das linke Auge blieb unbehandelt. Prophylaktisch erfolgte die subkonjunktivale Injektion in der afferenten Phase an den Tagen -1, 1, 3 und 5 nach der aktiven Immunisierung. Zur therapeutischen Behandlung erfolgte die subkonjunktivale Injektion in der efferenten Phase an den Tagen 6, 9 und 12 nach der aktiven Immunisierung (Tabelle 1; siehe S. 52). Kontrolltieren wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten 30 µl PBS subkonjunktival injiziert.

2.2.3.5 Intravitreale Wirkstoffapplikation mit einer Glaskapillare

Die Glaskapillaren mit Filament wurden mit einem Elektrodenpuller fein ausgezogen. Um eine stabile Injektionsnadel zu erhalten, wurde die Spitze der Glaskapillare abgebrochen. Das Injektionsvolumen von 2 µl wurde mit einer Pipette in dem Deckel eines Eppendorf-Gefäßes vorgelegt und per Kapillarkraft in die Injektionskapillare aufgesaugt. Die gefüllte Kapillare wurde in ein dicht abschließendes Drucksystem gesteckt. Das Drucksystem wurde über einen dünnen Gummischlauch mit einer luftgefüllten 50-ml-Spritze verbunden. Der Spritzenkolben wurde vorgeschoben, bis durch den gesteigerten Luftdruck das Injektionsvolumen aus der Kapillare gepresst wurde. Auch für die intravitrealen Injektionen wurden die Mäuse narkotisiert. Vor der Injektion wurde ein Tropfen Jod auf das Auge gegeben. Die Glaskapillare wurde mit Hilfe eines Operationsmikroskops im Bereich des Limbus in das linke Auge bis in den Glaskörperraum geführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Linse nicht verletzt wird. Das Injektionsvolumen wurde per Luftdruck aus der Kapillare in den Glaskörper gespritzt. Nachdem die Injektionsflüssigkeit die Kapillare verlassen hatte, wurde diese rasch wieder aus dem Auge herausgezogen. Das rechte Auge blieb unbehandelt.

2.2.3.6 Intravitreale Wirkstoffapplikation mit einer Mikroliterspritze

Bei dieser Applikationsmethode wurde anstelle der Glaskapillare eine 33-G-Kanüle mit scharfem Schliff für die Punktion des Auges verwendet. Die Kanüle wurde auf eine Mikroliterspritze (701 RN; siehe 2.1.7) geschraubt, mit der das Injektionsvolumen von 2 µl direkt aufgezogen werden konnte. Für die intravitreale Injektion wurde die flexible 33-G-

Kanüle mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand umfasst. Die Spritze wurde auf dem Handrücken balanciert. Mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand wurde zunächst der Kopf der Maus fixiert. Nachdem die Kanüle in den Glaskörperraum des linken Auges geführt worden ist, wurde der Kopf der Maus losgelassen. Die Position des Auges wurde nun durch die eingeführte Kanüle stabilisiert. Dadurch konnte mit der linken Hand der Kolben der Hamilton-Spritze vorgeschoben werden, um die Flüssigkeit in den Glaskörper zu injizieren. Anschließend wurde der Kopf der Maus wieder mit der linken Hand festgehalten und die Kanüle vorsichtig aus dem Auge herausgezogen.

2.2.3.7 Intravitreale Applikation von Etanercept

Die Mäuse wurden prophylaktisch in der afferenten Phase an den Tagen -1, 2 und 5 oder therapeutisch in der efferenten Phase an den Tagen 6, 9 und 12 nach der aktiven Immunisierung durch intravitreale Injektion behandelt (Tabelle 1; siehe S. 52). Dabei wurden den Mäusen zu den entsprechenden Zeitpunkten 50 µg Etanercept in einem 2 µl Volumen in den Glaskörper des linken Auges injiziert. Das rechte Auge blieb unbehandelt. Kontrolltieren wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten 2 µl PBS intravitreal injiziert.

2.2.3.8 Lokale Applikation von Antisense-Oligonukleotiden (ASON)

Zur lokalen Behandlung der Mäuse mit ASON wurden die gleichen Applikationsmethoden (intravitreal oder subkonjunktival) und gleichen Behandlungsschemata (afferente oder efferente Phase) mit den zugehörigen Behandlungszeitpunkten angewendet wie bei der lokalen Behandlung mit Etanercept (Tabelle 1). Die Nukleotidabfolge der eingesetzten ASON war CGA AGT TCA GTA GAC AG und entsprach damit den komplementären Basen zu den Nukleotiden 300 bis 316 der vollständigen Nukleotidsequenz der murinen TNF- α -mRNA. Durch Lösung der ASON in von der Herstellerfirma bereitgestelltem Puffer wurde eine 100-µM-Stocklösung angefertigt. Sowohl gelöste als auch ungelöste ASON wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die intravitrealen Behandlungen wurden den Mäusen 2 µl der 100-µM-Stocklösung zu den entsprechenden Zeitpunkten injiziert. Bei den subkonjunktivalen Applikationen wurden 30 µl injiziert. Um sequenzunabhängige Effekte der ASON auszuschließen, erhielten Kontrolltiere entsprechende Volumina einer 100-µM-Lösung von Kontrolloligonukleotiden (KON). Die KON mit der Nukleotidabfolge ACT ACT ACA CTA GAC TAC hatten die gleiche chemische Modifikation (phosphorothioiert) wie die verwendeten ASON sowie eine ähnliche Anzahl an Nukleotiden. Allerdings hatten sie weder die Fähigkeit mit der Ziel-mRNA noch mit einer anderen zellulären mRNA zu hybridisieren

(Informationen der Herstellerfirma). Als weitere Kontrolle erhielten Gruppen von Mäusen entsprechende Volumina eines selbst angesetzten TE-Puffers (Abschnitt 2.1.9.1.). In vitro Untersuchungen zur Hemmung der TNF- α -Expression durch die eingesetzten ASON an Knochenmarkmakrophagen werden an späterer Stelle beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.18).

Tabelle 1: Behandlungsschemata für die Etanercept-Applikation

Injektion	Zeitpunkte - afferente Phase [Tage nach der Immunisierung]	Zeitpunkte - efferente Phase [Tage nach der Immunisierung]
Intraperitoneal	-1, 1, 3 und 5	6, 9 und 12
Intravitreal	-1, 2 und 5	6,9 und 12
Subkonjunktival	-1, 1, 3 und 5	6, 9 und 12

2.2.4. In vivo Untersuchung des Augenhintergrundes

Für die Untersuchung des Augenhintergrundes und eine klinische Einschätzung der induzierten EAU am lebenden Tier wurden die Mäuse lokal am Auge mit einem Tropfen Proxymetacain (Proparacain-POS® 0,5 %) betäubt. Anschließend wurde durch das Tropfen von Tropicamid (Mydriaticum Stulln) auf das Auge eine Mydriasis erzeugt. Die Mäuse wurden durch einen Nackenfellgriff mit der linken Hand fixiert. Durch das Auflegen eines Kontaktglases in Form eines Objektträgers auf die Kornea konnten der Augenhintergrund und mögliche pathologische Veränderungen mit Hilfe eines Operationsmikroskops betrachtet werden. Um Abrasionen der Kornea dabei zu vermeiden, wurde zuvor ein Tropfen einer hochviskösen Lösung von Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel® 2%) auf den Objektträger gegeben.

2.2.5 Töten der Versuchstiere

Da beim Töten der Mäuse durch zervikale Dislokation der Augeninnendruck ansteigen kann, wurde diese Methode nur dann eingesetzt, wenn die Augen anschließend nicht für weitere Untersuchungen benötigt wurden, um artifizielle Veränderungen zu vermeiden. Sofern auch die Augen entnommen wurden, wurden die Tiere in einer CO₂-Kammer getötet.

2.2.6 Organentnahme

2.2.6.1 Entnahme der Augen

Die Augen wurden unmittelbar nach dem Töten entnommen. Dazu wurde eine Schere unter den Bulbus und anschließend in nasaler Richtung weitergeführt, wodurch der Bulbus aus der

Augenhöhle herausgezogen werden konnte. Die entnommenen Augen wurden entweder fixiert oder in ein Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 Entnahme von Milzen und Lymphknoten

Für die Entnahme von Milzen und Lymphknoten wurden die Mäuse nach dem Töten in einem Becherglas mit 70 % Ethanol getränkt. Neben der Milz wurden die jeweils paarigen Lymphknoten über der linken und rechten Speicheldrüse sowie ein auf jeder Seite lateral zu den Speicheldrüsen gelegener Lymphknoten herauspräpariert. Dementsprechend wurden pro Maus sechs Lymphknoten entnommen. Diese vom Auge abführenden Lymphknoten werden im Folgenden als regionale Lymphknoten bezeichnet. Das verwendete Präparierbesteck wurde vor der Entnahme der Organe in 70 % Ethanol getaucht und desinfiziert. Nach der Entnahme wurden die Organe in gekühltes PBS mit 1 % Ciprofloxacin (v/v) gegeben.

2.2.7 Histologische Beurteilung des EAU-Schweregrades

2.2.7.1 Erstellung histologischer Gewebeschnitte von Mäusaugen

Der Schweregrad der Entzündung bei experimenteller autoimmuner Uveoretinitis wurde histologisch anhand von Gewebeschnitten fixierter und in Paraffin eingebetteter Augen ermittelt. Dazu wurden die Augen unmittelbar nach der Entnahme für ca. 24 Stunden in eine Fixierlösung auf Formaldehydbasis (siehe 2.1.9.2) gegeben. Das in der Fixierlösung enthaltene Isopropanol führt zu einem Wasserverlust des Gewebes und damit zu einer partiellen Denaturierung von Proteinen. Die Fixierung erfolgt durch das verdünnte Formalin, wobei eine Vernetzung sowohl von nicht als auch von leicht denaturierten Proteinen durch das Formaldehyd erzielt wird. Der Zusatz von Essigsäure führt ebenfalls zu einer leichten Denaturierung von Proteinen und einer Fixierung von Nukleoproteinen, die das Hervortreten und die Färbbarkeit von Kernstrukturen fördert (Böck 1989). Nach vollständiger Fixierung, die nach 24 Stunden bei Gewebestücken in der Größenordnung eines Mäusauges abgeschlossen ist (Böck 1989), wurden die Augen in einer Reihe von Isopropanollösungen aufsteigender Konzentrationen dehydriert. Dazu wurden die Augen anfänglich für 30 Minuten in 70 % Isopropanol gegeben. Anschließend wurden die Augen für 40 Minuten in 80 % und für weitere 50 Minuten in 90 % Isopropanol überführt. Danach wurden die Augen für eine Stunde in 96 % und dreimal für je eine Stunde in 100 % Isopropanol gegeben. Nach der Entwässerung wurde das Gewebe zur Paraffineinbettung zunächst bei etwa 70 °C in ein Intermedium gegeben, was zu gleichen Teilen aus Isopropanol und Paraffin bestand. Nach 30 Minuten wurden die Präparate für weitere 30 Minuten in reines, aufgeschmolzenes Paraffin

überführt. Auf diesen Schritt folgte ein weiteres 100 %iges Paraffinbad für 30 Minuten. Danach wurden die Augen aus den Präparatebehältern herausgenommen und in entsprechenden Einbettformen in Paraffin gegossen.

Die erstarrten Paraffinblöcke wurden mit einer Rasierklinge oder einem Skalpell so zurechtgeschnitten, dass sie auf ein Holzklötzchen aufgeklebt werden konnten. Das Holzklötzchen wurde in einem Rotationsmikrotom eingespannt und derart ausgerichtet, dass medio-sagitale Gewebeschnitte der Augen angefertigt werden konnten. Die Gewebeschnitte hatten eine Dicke von 7 µm. Die Augen wurden bis zur Mitte geschnitten. Von jedem Auge wurden aus vier verschiedenen Ebenen der geschnittenen Augenhälfte je zwei Objektträger mit aufeinanderfolgenden Serienschnitten aufgenommen. Die Paraffinschnitte wurden mittels eines kalten Wasserbades (A. dest.) auf APES-beschichtete Objektträger überführt und in einem warmen Wasserbad gestreckt. Zur APES-Beschichtung wurden die Objektträger in einer Küvette mit 96 % Ethanol gereinigt. Anschließend wurden die Objektträger für 2 Minuten in eine Küvette mit Aceton gegeben, bevor sie für mindestens 30 Sekunden in eine Küvette mit 2% APES in Aceton überführt wurden. Für 2 weitere Minuten wurden die Objektträger erneut in reines Aceton getaucht. Schließlich wurden die Objektträger mit A. dest. gespült und im Wärmeschrank bei ca. 60°C und Frischluftzufuhr getrocknet. Für einen besseren Halt der Paraffinschnitte auf den Objektträgern wurden zusätzlich zu der APES-Beschichtung 0,5 g Gelatine in dem Streckbad gelöst. Nach dem Aufziehen auf die Objektträger wurden die Paraffinschnitte auf einer Wärmeplatte luftgetrocknet.

2.2.7.2 Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte

Für die Ermittlung des EAU Schweregrades wurde eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) der Gewebeschnitte angefertigt. In drei aufeinanderfolgenden mit Xylol gefüllten Küvetten wurde das Paraffin aus dem Gewebe herausgelöst. Danach wurden die Gewebeschnitte in einer Alkoholreihe absteigender Konzentrationen bis in A. dest. überführt. Durch den Einsatz der Hämatoxylinlösung wird eine selektive Kernfärbung erreicht, die durch das Bläuen in methanolhaltiger Bläuenlösung fixiert wurde. Nach zwei Waschschritten in A. dest. wurde eine Gegenfärbung mit Eosin in alkoholischer Lösung durchgeführt, wobei basophile Strukturen wie Plasmaproteine pink-rosa gefärbt wurden. Mittels eines Deckgläschens und einem Einschlussmedium wurden die gefärbten Objektträger bzw. Gewebeschnitte konserviert. Da mit Eukitt ein wasserunlösliches und Xylol-haltiges Einschlussmedium verwendet wurde, mussten die Gewebeschnitte über eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen dehydriert und in Xylol gebracht werden. Mit einem

Glasstäbchen wurden drei bis vier Tropfen des Einschlussmediums auf den Objektträger gegeben. Mit einer Pinzette wurde ein Deckgläschen langsam auf den Objektträger abgelassen und angedrückt, sodass sich das Einschlussmedium gleichmäßig zwischen Objektträger und Deckgläschen verteilte.

Protokoll zur Hämatoxylin und Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

3 x 5-10 Minuten in Xylol

2 x 3 Minuten in 100 % Ethanol

1 x 3 Minuten in 96 % Ethanol

1 x 3 Minuten in 80 % Ethanol

1 x 3 Minuten in 70 % Ethanol

2 x Spülen in A. dest.

1 x 30 Sekunden in Hämatoxylinlösung (Instant Hämatoxylin Komponente A + B)

2 x Spülen in A. dest.

1 x 3 Minuten in Bläuen-Lösung

2 x Spülen in A.dest.

1 x 30 Sekunden in Eosin Y

3 x 3-5 Minuten in 96 % Ethanol

2 x 3 Minuten in 100 % Ethanol

3 x 3 Minuten in Xylol

Eindecken mit Deckgläschen und Eukitt als Einschlussmedium

2.2.7.3 Bestimmung des EAU-Schweregrades

Die Bestimmung des EAU-Schweregrades anhand der HE-gefärbten Gewebeschnitte des Auges erfolgte gemäß eines etablierten Schemas mit definierten Bewertungskriterien nach Caspi et al. Obwohl im histologischen Bild von Mäusaugen, die von einer EAU betroffen waren, häufig auch der vordere Augenabschnitt pathologische Veränderungen in Form von geweiteten Irisgefäßen und Zellinfiltrationen in Iris und Vorderkammer aufwies, ist das EAU-Modell bei der Maus in erster Linie als Erkrankung des posterioren Augenabschnittes beschrieben, da dort das immunisierende Antigen vorkommt. Daher basieren die Bewertungskriterien auf der Art, Anzahl und Größe von Läsionen in der Netzhaut und der Choroidea. Von jedem Auge wurden drei Gewebeschnitte aus unterschiedlichen Ebenen mit Hilfe des Lichtmikroskops histopathologisch beurteilt und mit einem Entzündungsgrad von 0 bis 4 bewertet. Der Entzündungsgrad des Auges entsprach dem Mittelwert der drei beurteilten Gewebeschnitte. Treten keine Entzündungszeichen auf, wird der entsprechende Schnitt mit

einer 0 bewertet. Das Auftreten minimaler Entzündungszeichen, d.h. eine leichte Infiltration von Entzündungszellen in die Netzhaut und den Glaskörperraum ohne Zerstörung von Gewebe und Photorezeptoren wird mit 0,5 bewertet. Bei einer Perivaskulitis, d.h. der verstärkten Infiltration von Entzündungszellen aus den in der Ganglienzellschicht der Retina gelegenen Gefäßen sowie einzelnen fokalen Läsionen und kleinen Falten der Netzhaut entspricht der Entzündungsgrad einer 1. Im Bereich fokaler Läsionen ist die Schichtung der Retina diffus, und der Verlust von Zellkernen, zumeist in der äußeren Körnerschicht, signalisiert den Ausfall von Photorezeptoren. Ab einem Entzündungsgrad von 2 zählen häufige Faltungen der Netzhaut zu den charakterisierenden Merkmalen. Zudem treten kleine granulomatöse Läsionen in der Retina und Choroidea und fokale Netzhautablösungen mit serösem Exudat auf. Bei einem höheren Entzündungsgrad von 3 werden derartige Netzhautablösungen mit serösem Exudat und granulomatöse Läsionen großflächiger. Durch die starke Infiltration von Entzündungszellen geht die retinale Struktur über weite Bereiche verloren. Zudem kommt es zu einer Bildung von Dalen-Fuchs-Knoten, die als Granulome auf Ebene des retinalen Pigmentepitheliums definiert sind und bis in die äußere Körnerschicht hineinreichen. Auch die Neubildung von Blutgefäßen im Bereich der äußeren Photorezeptorsegmente und des retinalen Pigmentepitheliums sind charakteristisch für diesen Entzündungsgrad. Der schwerste Entzündungsgrad von 4 wird vergeben, wenn die retinale Architektur durch schwere Infiltration von Entzündungszellen, der großflächigen Zerstörung von Photorezeptoren und granulomatöse Läsionen nahezu vollständig zerstört ist (Caspi et al. 1988; Chan et al. 1990; Caspi et al. 1993; Agarwal & Caspi 2004).

2.2.8 Kultivierung von Zellen aus der Milz und den regionalen Lymphknoten

2.2.8.1 Erstellung von Einzelzellsuspensionen

Die Erstellung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz und den regionalen Lymphknoten erfolgte unter keimarmen Bedingungen unter der Sterilwerkbank. Die verwendeten Materialien waren vom Hersteller steril verpackt oder wurden andernfalls vor der Benutzung autoklaviert. Für die Zellkultur verwendete Lösungen wurden steril filtriert. Die Organe wurden in einer Zellkulturschale mit dem Stempel einer Einwegspritze (10 ml) zerrieben, wobei die Zellen aus dem Gewebeverband herausgelöst wurden. Die Einzelzellsuspensionen wurden wieder zurück in die Röhrchen gegeben, die komplett mit PBS aufgefüllt wurden. Anschließend wurden die Einzelzellsuspensionen für 10 Minuten bei 486 x g zentrifugiert, sodass die Zellen am Grunde der Röhrchen ein Pellet bildeten. Der flüssige Überstand wurde abgegossen. Zur Lyse von Erythrozyten wurde nun Haemolysepuffer auf die Zellen gegeben.

Pro Milz wurden 5 ml Hämolysepuffer eingesetzt. Waren die Zellen mehrerer Milzen in einem Röhrchen vereint, wurden maximal 20 ml des Hämolysepuffers pro 50-ml-Röhrchen eingesetzt. Bei den Lymphknotenproben in 15-ml-Röhrchen wurde 1 ml Hämolysepuffer verwendet. Das Zellpellet wurde mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers in dem Hämolysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Sekunden wurden die Röhrchen mit PBS aufgefüllt und die Einzelzellsuspension erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift zur Verdünnung des Hämolysepuffers wurde ein weiteres Mal durchgeführt, bevor die Milz- bzw. Lymphknotenzellen in Lymphozytenmedium aufgenommen und resuspendiert wurden.

2.2.8.2 Bestimmung der Zellzahl mit einer Zählkammer nach Neubauer

Zur Bestimmung der Zellkonzentration von Einzelzellsuspensionen der Milz wurde ein Aliquot der Zellsuspension zur Erstellung einer 1:100-Verdünnung entnommen. Etwa 10 µl der 1:100-verdünnten Zellsuspension wurde auf die Zählkammer nach Neubauer gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Invertmikroskops mit Phasenkontrast. Dabei wurden vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Jedes Großquadrat bestand aus $4 \times 4 = 16$ kleinen Quadraten. Zellen, die auf der linken oder oberen Begrenzung eines kleinen Quadrates lagen, wurden mitgezählt. Zellen, die auf der rechten oder der unteren Begrenzung eines kleinen Quadrates lagen, wurden nicht mitgezählt. Zudem wurden Zellen, die im lichtmikroskopischen Hellfeld dunkel und grau erschienen, nicht berücksichtigt, da diese als tote Zellen gewertet wurden. Bei diesbezüglicher Unsicherheit konnte zur Erstellung der Verdünnung Trypanblaulösung verwendet werden. Trypanblau tritt durch die Zellmembran toter Zellen hindurch und färbt diese selektiv an. Zur Bestimmung der Zellkonzentration von Einzelzellsuspensionen der Lymphknoten wurden 1:10-Verdünnungen der Zellsuspension verwendet. Die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension berechnete sich schließlich wie folgt: Durchschnittliche Anzahl vitaler Zellen der 4 Großquadrate \times Verdünnungsfaktor $\times 10^4$ (konstanter Faktor der Zählkammer).

2.2.8.3 Aussaat und Inkubation der Zellen

Durch die Zugabe entsprechender Mengen an Lymphozytenmedium wurden die Einzelzellsuspensionen auf eine bestimmte Anzahl an Zellen pro ml eingestellt. Anschließend konnten die Zellen auf Zellkulturplatten oder in Zellkulturflaschen ausgesät und stimuliert werden. Die antigenspezifische Stimulation erfolgte durch Zugabe von IRBPp161-180. Als Positivkontrolle wurden die Zellen unspezifisch mit 8 µg/ml des Mitogens Concanavalin A (ConA) stimuliert. Die Inkubation der Zellen in Lymphozytenmedium ohne weitere

Stimulation lieferte die Negativkontrolle bzw. Basis- oder Hintergrundwerte für die entsprechenden Funktionstests. Die Inkubation der kultivierten Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 %. Die Aussaatdichte der Zellen, die Menge des eingesetzten IRBPp161-180 zur antigenspezifischen Stimulation sowie die Inkubationszeit konnten in Abhängigkeit des jeweiligen Funktionstest variieren und sind den entsprechenden Beschreibungen an späterer Stelle zu entnehmen.

2.2.9 Proliferationsassay

Einzelzellsuspensionen von Zellen aus der Milz und den regionalen Lymphknoten wurden auf einer 96-Felder-Rundbodenplatte ausgesät. Dabei betrug die Zellzahl $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung bei einem Endvolumen von 180 µl. Zur antigenspezifischen Stimulation wurden die Zellen mit 10 µg/ml IRBPp161-180 inkubiert. Als unspezifische Positivkontrolle wurden die Zellen mit 8 µg/ml ConA und für eine Negativkontrolle ausschließlich mit Medium inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurde zu jeder Vertiefung 1 µCi [3H]-Thymidin gegeben. Die Zellen wurden für etwa 19 weitere Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Rundbodenplatten bei -20°C eingefroren und so bis zur Ernte der Zellen gelagert. Bei der Zellernte wurde der Inhalt einer jeden Vertiefung mit einem Filtermatten-Harvester auf eine 96-Felder-Filtermatte abgesaugt, die die Zellen selektiv auffängt. Die Filtermatten wurden für 1 bis 2 Stunden in einem Wärmeschrank bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurden die Filtermatten in Szintillationsflüssigkeit getränkt und in einen Probenbeutel aus Plastik eingeschweißt. Als Maß für die Proliferation wurde der Einbau des mit radioaktivem Wasserstoff markierten Thymidin ([3H]-Thymidin) in die DNA der Zellen bestimmt. Dazu wurde die Radioaktivität (β-Strahlung) mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers gemessen. Bei vereinten Organen einer Gruppe wurde jeder Probenansatz in achtfacher Bestimmung gemessen. Bei Einzeltieren wurde jeder Probenansatz in vierfacher Bestimmung gemessen.

2.2.10 Bestimmung des Zytokingehaltes in Zellkulturüberständen

Einzelzellsuspensionen von Zellen aus der Milz und den regionalen Lymphknoten wurden auf eine Zellzahl von 6×10^6 Zellen pro ml eingestellt und in einem Volumen von 500 µl pro Vertiefung auf einer 24-Felder-Zellkulturplatte ausgesät. Wie für den Proliferationsassay auch wurden die Zellen antigenspezifisch mit IRBPp161-180 (10µg/ml) oder unspezifisch mit ConA (8 µg/ml) stimuliert oder als Negativkontrolle ausschließlich mit Medium inkubiert. Die Inkubation im CO₂-Inkubator erfolgte für 24 Stunden. Danach wurden die Einzelzellsuspensionen aus den Vertiefungen der 24 Felder-Zellkulturplatten abgesaugt, in ein

Eppendorf-Gefäß gegeben und für 5 min bei 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand über dem so gebildeten Zellpellet wurde abgenommen und bis zur Analyse des Zytokingehaltes in einem verschlossenen Greiner-Röhrchen bei mindestens -20 °C gelagert. Die Quantifizierung des Gehaltes an verschiedenen Zytokinen erfolgte per ELISA gemäß des Durchführungsprotokolls des entsprechenden ELISA-Kit-Herstellers. Dabei wurde eine 96-Felder-Nunc-ImmunoTM-Platte mit einem für das zu untersuchende Zytokin spezifischen Antikörper über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Antikörper wurden gemäß den Angaben des Herstellers in einem ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt. Bei der Beschichtung der Nunc-ImmunoTM-Platte binden die Antikörper mit ihrem antigenunspezifischen Fc-Teil an der Kunststoffbegrenzung der einzelnen Vertiefungen. Überschüssige, nicht gebundene Antikörper werden tags darauf durch mehrmaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Vertiefungen anschließend mit ELISA-Verdünnungslösung (200 µl pro Vertiefung) für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach dem Block-Schritt erfolgten weitere Waschschrte mit Waschpuffer. Durch Zugabe von 100 µl pro Vertiefung der jeweiligen Probe konnte das untersuchte Zytokin an dem dafür spezifischen Beschichtungsantikörper binden. Die Proben wurden in einer 1:3 Verdünnung aufgetragen und für 2 Stunden inkubiert. Es wurden von jeder Probe Zweifach-Bestimmungen durchgeführt. Auf die Inkubation der Proben erfolgten erneut Waschschrte, bevor der Detektionsantikörper in die Vertiefungen gegeben wurde. Der Detektionsantikörper wurde entsprechend der Hersteller-Angaben in Verdünnungslösung verdünnt. Der an ein Biotin-Molekül gekoppelte Detektionsantikörper bindet spezifisch an das an den Beschichtungsantikörper gebundene Zytokin. Überschüssige, nicht gebundene Antikörper wurden in anschließenden Waschschrten entfernt. Neben dem Detektionsantikörper wurde eine an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase in der Verdünnungslösung gelöst, die das farblose Substrat Tetramethylbenzidin in ein blaues Endprodukt umwandelt. 10 mg des Substrates wurden in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst und zu 99 ml ELISA-Substratpuffer zugegeben. Nach Aktivierung mit 13 µl 30 % Wasserstoffperoxid wurden 100 µl dieser Substratlösung in jede Vertiefung gegeben. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (1 M) in jede Vertiefung abgestoppt. Dabei ist ein Farbumschlag von blau zu gelb zu beobachten. Durch die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin bindet die Meerrettichperoxidase an den Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper. Da überschüssiges Enzym mit Waschpuffer ausgewaschen wurde, tritt nur dort eine Farbreaktion auf, wo das untersuchte Zytokin spezifisch an Beschichtungs- und Detektionsantikörper gebunden ist. Je höher der Gehalt an dem Zytokin in den Zellkulturüberständen ist, desto stärker ist die

Färbung, die mit einem Achtkanal-Photometer als Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen wurde. Auf der Nunc-ImmunoTM-Platte wurde eine Zweifach-Bestimmung einer Standard-Reihe, d.h. einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Zytokins mit bekannter Konzentration, mitgeführt. Ausgehend von der höchsten Konzentration des Standard-Proteins wurde die Konzentration bei jeder Stufe der Verdünnungsreihe halbiert. Die Konzentration des Zytokinstandards wurde in einem Koordinatensystem auf der X-Achse gegen die gemessenen OD-Werte auf der Y-Achse aufgetragen. Es wurde eine Regressionsgerade errechnet, zu der jeder Messpunkt den geringst möglichen Abstand hat. Mit Hilfe der Geradengleichung, die diese Regressionsgerade beschreibt, ließen sich die Messwerte der OD der verschiedenen Proben in die Zytokinkonzentration umrechnen. Die für einen ELISA verwendeten Beschichtungsantikörper, Detektionsantikörper, die Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase sowie der Protein-Standard wurden ausschließlich dem entsprechenden ELISA-Kit entnommen. Der Proteinstandard wurde in 1ml A. dest. gelöst und in 30- μ l - liquots bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.11 EAU Induktion durch adoptiven Transfer

Beim adoptiven Transfer-Modell wurden Empfängertieren uveitogene T-Lymphozyten übertragen, die aus aktiv immunisierten, syngenem Spendertieren gewonnen wurden. Die Spendertiere wurden, wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben, aktiv immunisiert. Um eine starke EAU auszulösen, wurde die Emulsion aus IRBPp161-180 und CFA für 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Durch die Ultraschallbehandlung wird die Emulsion zu einer zähen Creme, die für einen längeren Zeitraum subkutan an der Injektionsstelle verweilt. Während der Ultraschallbehandlung wurde das Gefäß mit der Emulsion in ein Eiswasserbad gestellt. Zum Zeitpunkt der stärksten aktiven Entzündung während des EAU-Verlaufes an Tag 14 nach der aktiven Immunisierung wurden die Spendertiere getötet. Zur Gewinnung der uveitogenen T-Zellen wurden den Spendertieren die Milz und die regionalen Lymphknoten entnommen und in eine Einzelzellsuspension überführt (siehe Abschnitt 2.2.6.2 und 2.2.8.1). Einzelzellsuspensionen aus Zellen der Milz und den regionalen Lymphknoten wurden vereint und mit Lymphozytenmedium auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Einzelzellsuspension wurden 20 ml in 75-cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden antigenspezifisch mit 20 μ g/ml IRBPp161-180 stimuliert und bei 5 % CO₂ und 37 °C für 72 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden und erneut nach 48 Stunden wurden die Zellkulturflaschen vorsichtig geschüttelt und anschließend die Einzelzellsuspensionen in neue

Zellkulturflaschen überführt. Adhärenente Zellen am Boden der alten Zellkulturflaschen wurden verworfen. So konnten adhärenente von nicht adhärenenten Lymphozyten sukzessive getrennt werden. Die nicht adhärenenten, antigenspezifischen, uveitogenen Lymphozyten wurden nach der 72-stündigen Inkubation durch eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereingt. Dazu wurden 20 ml Ficoll-PaqueTM PLUS in ein 50-ml-Röhrchen vorgelegt. Um eine Phasentrennung zu erhalten, wurden 10 ml der Einzelzellsuspension langsam auf die Ficoll-Phase pipettiert. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 863 x g und ausgeschalteter Bremse für 10 Minuten bildeten vitale Zellen eine Schicht in dem Übergangsbereich der Ficoll-Phase und der Medium-Phase, während abgestorbene Zellen und deren Zellwandbestandteile ein Pellet am Grunde des 50-ml-Röhrchens bildeten. Die Schicht vitaler Zellen wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50-ml-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS in RPMI resuspendiert. Zur Auslösung der EAU durch adoptiven Transfer wurden jedem Empfängertier etwa 2×10^7 dieser antigenspezifischen Lymphozyten in einem Volumen von 200 µl intraperitoneal injiziert. Damit erfolgte die EAU-Induktion durch adoptiven Transfer in Anlehnung an das Protokoll von Agarwal und Caspi (Agarwal und Caspi 2004).

Eine Gruppe der Empfängertiere wurde an den Tagen -1, 1, 3 und 5 nach dem adoptiven Transfer systemisch mit 200 µg Etanercept pro Maus behandelt. Kontrolltieren wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten 200 µl PBS intraperitoneal injiziert.

2.2.12 Induktion einer Glaskörperraum-assoziierten Immundeviation

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Abschnitt 1.3), stellt ACAID eine vom gewöhnlichen Ablauf abweichende Immunantwort dar, bei der in Reaktion auf ein in der Vorderkammer des Auges platzierten oder auftretenden Fremdanitens regulatorische T-Zellen in der Peripherie induziert werden, die eine intraokuläre Entzündung supprimieren (Streilein 2003). Eine solche abweichende Immunreaktion kann auch durch die Positionierung von Fremdanitens im Glaskörperraum ausgelöst werden, was dementsprechend als VCAID (engl. vitreous cavity associated immune deviation) bezeichnet wird (Sonoda et al. 2005).

Hier wurde untersucht, inwieweit die intravitreale Applikation von Etanercept einen Einfluss auf die Auslösung oder den Ablauf dieser Immunantwort hat. VCAID wurde durch die intravitreale Injektion von Ovalbumin (OVA) ausgelöst. Als Maß für die VCAID-Induktion wurde die Fähigkeit zur Ausbildung einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (DTH) bestimmt.

Für die Positivkontrolle wurden einer Gruppe von Mäusen 50 µg OVA in einem Volumen von 2 µl PBS durch intravitreale Injektion in den Glaskörper appliziert. Für eine weitere Gruppe von Mäusen wurde das OVA in der Etanercept-Stocklösung gelöst. Durch die intravitreale Injektion von 2 µl wurden so 50 µg OVA und 50 µg Etanercept gleichzeitig in den Glaskörper appliziert. Als Negativkontrolle zur VCAID-Induktion wurden ausschließlich 2 µl PBS intravitreal injiziert. Sieben Tage nach den intravitrealen Injektionen wurden die Mäuse mit OVA immunisiert. Dabei wurden 100 µg OVA in Emulsion mit CFA (die Volumenanteile der OVA-Lösung und CFA betrugen 1:1) subkutan injiziert. Das Gesamtvolumen der applizierten Vakzine betrug 200 µl. Nach sieben weiteren Tagen, d.h. 14 Tage nach der intravitrealen Injektion, wurde die DTH induziert.

2.2.13 Induktion einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (DTH)

Zur Induktion der DTH wurden den Mäusen 200 µg OVA in einem Volumen von 10 µl mit Hilfe einer Hamilton-Spritze und einer 30-G-Kanüle subkutan am rechten Fußballen injiziert. Am linken Fußballen wurde ausschließlich das entsprechende Volumen an PBS unter die Haut gespritzt. Nach 24 Stunden wurde die Dicke von linkem und rechtem Fußballen mit Hilfe eines digitalen Mikrometers gemessen. Zur Erhaltung eines Basiswertes wurde die Dicke der Fußballen auch unmittelbar vor der Injektion von OVA bzw. PBS bestimmt. Durch die Bildung der Differenz des Wertes nach 24 Stunden und des Basiswertes konnte die Schwellung des Fußballens ermittelt werden. Die DTH entsprach der Differenz der Schwellung von rechtem und linkem Fußballen und wurde wie folgt berechnet: (24 h Messung des rechten Fußballens – 0 h Messung des rechten Fußballens) – (24 h Messung des linken Fußballens – 0 h Messung des linken Fußballens).

2.2.14 Aufnahme FITC-markierter Kontrolloligonukleotide nach lokaler Applikation

Um die Aufnahme, Verteilung und Kinetik von Oligonukleotiden nach lokaler Applikation nachvollziehen zu können, wurden nicht immunisierten Tieren einmalig Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markierte Kontrolloligonukleotide (KON) intravitreal oder subkonjunktival injiziert. Die Nukleotidsequenz der FITC-markierten KON und der in Experimenten zur ASON-Behandlung eingesetzten KON war gleich. Auch die Dosierung entsprach der bei der ASON-Behandlung eingesetzten Dosis. Bei intravitrealer Applikation wurden 2 µl und bei subkonjunktivaler Applikation 30 µl einer 100-µM-Stocklösung FITC-markierter KON in den Glaskörperraum bzw. unter die Bindehaut des rechten Auges injiziert. Kontrolltieren wurden entsprechende Mengen TE-Puffer injiziert. Die Mäuse wurden einen

Tag, drei Tage oder fünf Tage nach der Injektion getötet. Die anschließend entnommenen Augen wurden für fluoreszenzmikroskopische Analysen aufgearbeitet. Einzelzellsuspensionen aus Milzen und den regionalen Lymphknoten wurden nach der Lyse der darin enthaltenen Erythrozyten mit dem Durchflusszytometer (Abschnitt 2.2.14.3.2) auf FITC-positive Zellen hin analysiert.

2.2.14.1 Fluoreszenzmikroskopie von Gewebeschnitten der Augen

Die zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach intravitrealer und subkonjunktivaler Injektion FITC-markierter KON entnommenen Augen wurden, wie in Abschnitt 2.2.7.1 beschrieben, fixiert, in Paraffin eingebettet und mit dem Rotationsmikrotom geschnitten. Die auf Objektträger aufgezogenen, aber nicht entparaffinierten Gewebeschnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Filters, der das von FITC emittierte Licht passieren lässt, betrachtet. So konnte die Verteilung des FITC-Signals in den okulären Geweben untersucht werden.

2.2.14.2 Immunfluoreszenz-Färbung von saurem Gliafaserprotein

Die Immunfluoreszenz-Färbung von saurem Gliafaserprotein (GFAP; engl. glial fibrillary acidic protein) wurde an Gewebeschnitten von Augen durchgeführt, die zuvor intravitreal mit FITC-markierten KON injiziert wurden. Vor der Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst, wie vor einer HE-Färbung, in Xylol entparaffiniert und zur Hydratation in einer Alkoholreihe absteigender Konzentration in A. dest. geführt (siehe 2.2.7.2). Je nach Beschaffenheit des eingesetzten Primärantikörpers erfordert die Immunfluoreszenz- bzw. immunhistochemische Färbung Formalin-fixierter Gewebe ein Antigenretrieval. Durch die Fixierung mit Formaldehyd kommt es zu Vernetzungsreaktionen von Proteinen, wobei Epitope maskiert werden können. Durch ein Antigenretrieval können Quervernetzungen wieder rückgängig gemacht werden, sodass Epitope demaskiert vorliegen und wieder für die Bindung spezifischer Antikörper zur Verfügung stehen (Werner et al. 2000). Bei dieser Immunfluoreszenz-Färbung von GFAP wurde ein Antigenretrieval durch die Inkubation der Gewebeschnitte mit alkalischer Proteinase K Lösung für 20 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal für je 2 Minuten in einer Küvette mit 1 % FCS in PBS (PBS^S) gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurden die Schnitte mit 5 % Serum der identischen Tierspezies, in der der später eingesetzte Sekundärantikörper

generiert wurde, in PBS^S inkubiert. Der Zusatz des Serums verhindert, dass der Sekundärantikörper mit endogenen Immunglobulinen des Gewebes kreuzreagiert. In dem PBS zugesetzten FCS sind unspezifisch bindende Proteine enthalten, die das Gewebe absättigen, sodass durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommende, unspezifische Antikörperbindungen blockiert werden. Zudem wurde der Block-Lösung im Verhältnis 1:100 Fc-Block (siehe 2.1.2.1) zugesetzt. Fc-Block sind Antikörper, die spezifisch an Fc-Rezeptoren (CD16, CD32), wie sie beispielsweise auf der Zelloberfläche von Makrophagen vorkommen, binden. Durch Fc-Block wird verhindert, dass die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper mit ihrem nicht spezifischen Fc-Teil an Träger von Fc-Rezeptoren binden. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde die Blocklösung durch Klopfen des Objektträgers auf ein saugfähiges Papier entfernt. Anschließend wurde der Primärantikörper (Kaninchen anti-GFAP, siehe 2.1.2.1), der spezifisch an das Zielantigen GFAP bindet, in einer 1:250-Verdünnung in PBS^S auf die Gewebeschnitte gegeben und für 60 Minuten inkubiert. Um die Intensität unspezifischer Färbungen abschätzen zu können, wurde pro Objektträger ein Gewebeschnitt als Negativ-Kontrolle ohne Primärantikörper inkubiert. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurden die Objektträger in einer Küvette mit PBS^S dreimal für je zwei Minuten gewaschen. Wie der Primärantikörper auch, wurde der Sekundärantikörper (siehe 2.1.2.2.) in PBS^S verdünnt. Der Sekundärantikörper war an ein Biotinmolekül gekoppelt. Dem 1:50-verdünnten Sekundärantikörper wurden 5 % Mausserum zugegeben, was ebenfalls unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers an murines Gewebe blockiert. Die Sekundärantikörper-Präparation wurde vor Auftragen auf die Gewebeschnitte für 15 Minuten präinkubiert. Die Inkubationszeit des Sekundärantikörpers, der spezifisch an den Primärantikörper bindet, betrug 20 Minuten. Danach wurden die Gewebeschnitte erneut dreimal für je zwei Minuten in PBS^S gewaschen, bevor sie für 30 Minuten mit Phycoerythrin (PE)-gekoppeltem Streptavidin (Streptavidin-PE) inkubiert wurden. Das Streptavidin-PE wurde dazu 1:100 in PBS^S verdünnt. Nach zwei erneuten Waschschritten in PBS^S für jeweils 2 Minuten wurden die Gewebeschnitte mit Eindeckmedium für die Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.x.9.2.) und einem Deckgläschen eingedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Da das PE-markierte Streptavidin einen Komplex mit dem Biotin der Sekundärantikörper bildet, die wiederum spezifisch an die primären Antikörper binden, konnte die Lokalisation der Zielstruktur (GFAP) in den Gewebeschnitten der Augen durch Anwendung eines Filters, der das von PE emittierte Licht passieren lässt, beobachtet werden. Ein Filter, der sowohl für das von FITC als auch von PE emittierte Licht durchlässig ist, ermöglichte die simultane Betrachtung der Verteilung von

injizierten FITC-markierten KON und GFAP exprimierenden Zellen in den okulären Geweben.

2.2.14.3. Durchflusszytometrie

2.2.14.3.1 Allgemeine Prinzipien der Durchflusszytometrie und Funktion des Durchflusszytometers

Mit der durchflusszytometrischen Analyse können die verschiedenen Zellen einer heterogenen Zellsuspension quantifiziert und typisiert werden. In die Zellsuspension wird eine Kapillare eingetaucht, die die Zellsuspension durch ein Drucksystem in das Durchflusszytometer einsaugt. Der Probenstrom wird durch einen Hüllstrom aus einer Pufferlösung verdünnt und zentriert. Durch diese hydrodynamische Fokussierung werden die Partikel der Zellsuspension vereinzelt. Der einzelne Strom von Partikeln (laminarer Probenstrom) passiert schließlich einen Laserstrahl. Durch die hydrodynamische Fokussierung trifft der Laserstrahl auf jeden einzelnen Partikel der Zellsuspension. Die Beugung und Streuung des Laserstrahls an einem Partikel liefern Informationen über physikalische Eigenschaften der Partikel. Die Beugung verursacht eine Ablenkung des Laserstrahles in einem flachen Winkel und wird auch als Vorwärtsstreulicht bezeichnet, da es fast in Vorwärtsrichtung auf den Detektor trifft. Das Signal des Detektors wird dementsprechend als forward scatter (FSC) bezeichnet und dient als Maß für die Größe des Partikels bzw. der Zelle. Je größer die Zelle ist, desto größer ist das Signal des Vorwärtsstreulichts. Das Signal des sideways scatter (SSC) ist ein Maß für das Seitwärtsstreulicht, das dem im rechten Winkel zum Laserstrahl abgelenkten Licht entspricht. Die Seitwärtsstreuung liefert Informationen über die Granularität einer Zelle. Je stärker die Granularität einer Zelle ist, desto stärker ist das Seitwärtsstreulicht. Als Detektoren fungieren Photomultiplier, die die Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln. Das Signal jeder Einzelzelle wird in digitaler Form gespeichert. Über die Anregung von fluoreszierenden Markern ist eine simultane Analyse verschiedener Eigenschaften von Zellen der Zellsuspension möglich. Dabei werden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind und spezifisch an bestimmte, typisierende Oberflächenstrukturen oder intrazelluläre Antigene binden. Passieren die Zellen den Laserstrahl, werden die gebundenen Fluoreszenzmoleküle von dem Laser angeregt. Das bedeutet, dass Elektronen der Fluoreszenzmoleküle durch die Lichtenergie auf ein höheres Energieniveau der Elektronenhülle gehoben werden. Fallen die Elektronen anschließend wieder in einen energetisch niedrigeren und stabileren Zustand zurück, wird die frei werdende

Energie in Form von Wärme und Lichtenergie, deren Wellenlänge größer ist als die des Anregungslasers, emittiert. Die Fluoreszenzsignale werden in alle Richtungen emittiert. Detektiert wird wie das Seitwärtsstreulicht nur die senkrecht zum Anregungslaser emittierte Fluoreszenz. Durch Filter bzw. Farbteilerspiegel werden das Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzsignale voneinander getrennt und von separaten Detektoren registriert. Verschiedene Fluoreszenzmoleküle können durch die gleiche Wellenlänge eines Lasers angeregt werden, weisen daraufhin aber unterschiedliche Emissionsspektren auf. Daher kann die Expression mehrerer Antigene durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzmoleküle mit distinkten Emissionsspektren simultan analysiert werden. Die emittierten Fluoreszenzsignale einer markierten Zelle werden durch Filter, die jeweils nur für bestimmte Wellenlängen durchlässig sind, separiert und von entsprechenden Detektoren gemessen. Wird beispielsweise ein Antigen einer Zelle mit einem FITC-gekoppelten Antikörper markiert und ein weiteres Antigen der gleichen Zellen mit einem PE-gekoppelten Antikörper, lassen sich beide Fluoreszenzmoleküle durch das blaue Licht eines Argon-Lasers (488 nm) anregen. Als Reaktion auf diese Exzitation hin emittiert FITC mit höchster Intensität Licht einer Wellenlänge von 525 nm (grün). Ein Filter ist so ausgerichtet, dass im 90° Winkel zum Anregungslaserstrahl gestreutes bzw. emittiertes Licht jeglicher Wellenlänge diesen Filter passieren kann. Nur Licht der Wellenlänge von 525 +/- 20 nm wird von diesem Filter blockiert und auf den Detektor des FITC-Kanals reflektiert, wo das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt und digitalisiert wird. Dem Detektor des PE-Kanals ist ein Filter vorgeschaltet, der Licht der Wellenlänge 575 +/- 20 nm (orange) reflektiert, bei welchem Phycoerythrin (PE) sein Emissionsmaximum hat. Licht anderer Wellenlängen lässt der Filter passieren. Wie der Begriff Emissionsmaximum impliziert, emittiert ein angeregtes Fluoreszenzmolekül nicht Licht einer einzigen Wellenlänge, sondern eine Mischung verschiedener Wellenlängen. Daher emittiert FITC auch in geringer Intensität Licht der Wellenlänge von 575 nm, das im PE-Kanal gemessen wird, während von Phycoerythrin auch ein schwaches Signal im FITC-Kanal detektiert wird. Eine solche Überlappung der Emissionsspektren wird im Zuge der Kompensation korrigiert. Dazu wird bei einer Probe der Zellsuspension nur das Antigen mit dem FITC gekoppelten Antikörper markiert und in einer weiteren Probe ausschließlich das Antigen mit dem PE gekoppelten Antikörper. So kann der prozentuale Anteil des FITC-Signals bestimmt werden, der in den PE-Kanal strahlt und umgekehrt. Die Überlappung der Signale wird heraus gerechnet und korrigiert. (Ormerod 2000; Rahman 2006).

2.2.14.3.2 Untersuchung von Einzelzellsuspensionen der Milz und der regionalen Lymphknoten nach lokaler Applikation FITC-markierter KON mit dem Durchflusszytometer

Durch den Einsatz von FITC-markierten KON sollte der Abfluss von ASON sowie deren Aufnahme und Transport durch Zellen aus den regionalen Lymphknoten und der Milz nach lokaler Applikation nachvollzogen werden. Zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der lokalen Applikation FITC-markierter KON (siehe 2.2.14) wurden die Milz und die regionalen Lymphknoten, getrennt nach ipsi- und kontralateraler Seite zum behandelten Auge, entnommen und in Einzelzellsuspensionen überführt. Nach der Lyse der darin enthaltenen Erythrozyten wurden die Einzelzellsuspensionen mit Hilfe des Durchflusszytometers auf den

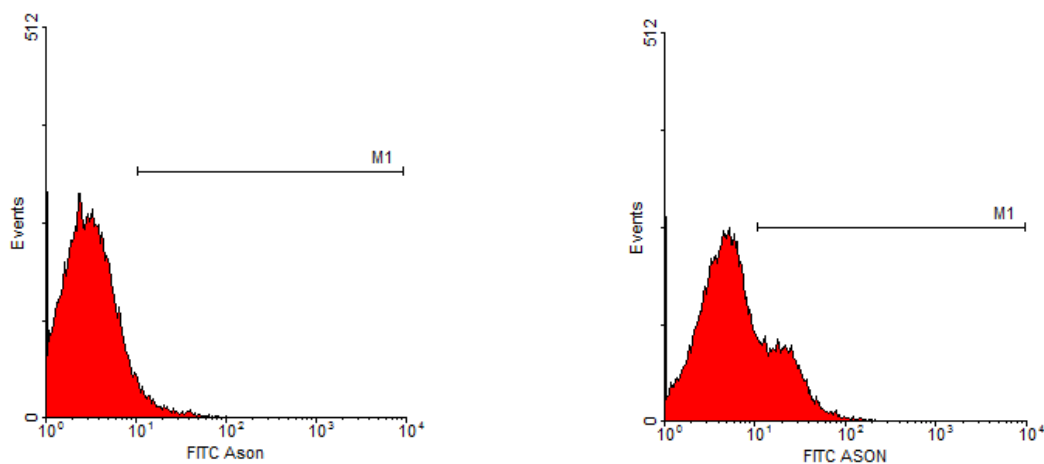


Abb. 1. Durchflusszytometrische Analyse der Einzelzellsuspension ipsilateraler Lymphknoten drei Tage nach subkonjunktivaler Injektion von (A) TE-Puffer als Kontrolle und (B) FITC-markierten Kontroll-Oligonukleotiden. Der Marker M1 definiert den prozentualen Anteil positiver Events im FITC-Kanal.

Anteil FITC-positiver Zellen hin analysiert. Zur Auswertung mit der Software WinMDI 2.8 wurde in einem Histogramm auf der X-Achse die Intensität der Fluoreszenz (im FITC-Kanal) und auf der Y-Achse die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Ausgehend von dem Histogramm der Negativkontrolle wurde ein Marker über den Fluoreszenzbereich von ca. 10^1 bis 10^4 der X-Achse gelegt. Es wurde definiert, dass Ereignisse, die im Bereich des Markers liegen, ein positives Fluoreszenzsignal mit ausreichender Intensität darstellen. Dabei entspricht jeder Partikel bzw. jede Zelle, die von dem Laser erfasst wurde, einem Ereignis. Die mit der Software aufgerufene Statistik gibt den prozentualen Anteil der Ereignisse an, die im Bereich des Markers liegen. Der so ermittelte Wert des Kontrolltieres, welches nicht mit FITC-markierten KON behandelt wurde, wurde als durch Autofluoreszenz bedingter

Hintergrund definiert. Der Marker der Negativ-Kontrolle wurde in die Histogramme der einzelnen FITC-behandelten Tiere übertragen. Der Hintergrund der Negativ-Kontrolle wurde von dem prozentualen Anteil der Ereignisse im Bereich des Markers bei FITC-behandelten Tieren subtrahiert, was als Maß für den Anteil FITC-positiver Zellen in dem entsprechenden Organ gewertet wurde.

2.2.15 Durchflusszytometrische Analyse von intrazellulärem TNF- α in Einzelzellsuspensionen der Milz nach Etanercept-Behandlung

Nach Anwendung der unterschiedlichen Schemata zur Behandlung mit Etanercept wurde der Anteil TNF- α -positiver Milzzellen bei behandelten Tieren und Kontrolltieren verglichen. Da T-Zellen und Makrophagen wichtige Produzenten von TNF- α sind, sollte der Anteil von CD4 bzw. F4/80 exprimierenden Zellen, die positiv für intrazelluläres TNF- α sind, in den Einzelzellsuspensionen der Milz mit dem Durchflusszytometer bestimmt werden. In eine Vertiefung einer 24-Felder-Platte wurde 1 ml einer Einzelzellsuspension von Milzzellen (6×10^6 Zellen) der jeweiligen Behandlungsgruppe gegeben und mit 250 ng/ml Ionomycin, 10 μ g/ml BrefeldinA und 10 ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für 3 bis 4 Stunden im CO₂-Inkubator bei 5 % CO₂-Konzentration und 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit einer Pipette aus den Vertiefungen der 24-Felder-Platte abgenommen und in 2 ml fassende Eppendorf-Gefäße überführt. Zum Waschen der Zellen wurden die Eppendorf-Gefäße mit PBS, das 10 % FCS (v/v) enthielt (PBS/10%FCS), aufgefüllt. Bei dem folgenden Zentrifugationsschritt wurden die Zellen bei 500 x g auf den Grund des Eppendorf-Gefäßes befördert, so dass sie ein Pellet bildeten. Die flüssige Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, sodass das Zellpellet in dem Eppendorf-Gefäß zurückblieb. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem PBS/10%FCS aufgenommen und resuspendiert. Die Färbung der Zellen mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern erfolgte in Greiner-Röhrchen. Dazu wurden je 100 μ l der Zellsuspension (ca. 1×10^6 Zellen) pro Probenansatz von einer Gruppe in ein Greiner-Röhrchen gegeben. Vor der Markierung der Oberflächenmarker CD4 und F4/80 mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD16/CD32 (BD Fc Block™, siehe 2.1.2.1) inkubiert. Dabei wurde der Fc-Block für die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Auf eine 15-minütige Inkubation bei 4°C folgte die extrazelluläre Färbung der Oberflächenmoleküle CD4 und F4/80 mit einem FITC-gekoppelten Anti-CD4-Antikörper bzw. einem Alexa Fluor® 647-gekoppelten Anti-F4/80-Antikörper (siehe 2.1.2.1). Von dem Antikörper gegen CD4 wurden

0,6 µl (0,15 µg) pro 1×10^6 Zellen in 100 µl Zellsuspension eingesetzt. Von dem Antikörper gegen F4/80 wurden 7 µl (0,35 µg) pro Probenansatz eingesetzt. Die anschließende 30-minütige sowie alle weiteren folgenden Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Inkubation wurden 2 Waschschrte mit PBS/10%FCS durchgeführt, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Nach der extrazellulären Färbung von CD4 und F4/80 wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde gepufferte 4 % Formaldehydlösung mit der Zellsuspension 1:2 verdünnt und für 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS/10%FCS und anschließend mit einem Gemisch (1:1 v/v) aus PBS/10%FCS und Saponinpuffer gewaschen. In einem weiteren Waschschrte wurde unverdünnter Saponinpuffer eingesetzt, der der Permeabilisierung der Zellen vor der Durchführung der intrazellulären TNF- α -Färbung diente. Vor der Zentrifugation im Zuge eines Waschschrtes mit Saponinpuffer wurden die Zellen für 2 Minuten inkubiert. Für die intrazelluläre TNF- α -Färbung wurde 1 µl (0,2 µg) pro Probenansatz von einem PE-gekoppelten Antikörper gegen TNF- α eingesetzt. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte für 45 Minuten. Nach der intrazellulären Färbung wurden die Zellen erneut zweimal in Saponinpuffer gewaschen und schließlich für die Analyse mit dem Durchflusszytometer in 100 µl Saponinpuffer aufgenommen.

Zur Einstellung des Durchflusszytometers für die Analyse der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zellen in den Einzelzellsuspensionen wurde von jeder Versuchsgruppe auch eine Probe mit ungefärbten Zellen mitgeführt. Die Kompensation wurde durch Proben erreicht, bei denen jeweils nur einer der Oberflächenmarker mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert wurde. Demnach waren Zellen einer Probe ausschließlich mit FITC-gekoppelten Anti-CD4-Antikörpern markiert, während Zellen einer anderen Probe der gleichen Versuchsgruppe ausschließlich mit Alexa Fluor® 647-gekoppelten Antikörpern markiert waren. Eine weitere Probe, wo beide Oberflächenmoleküle (CD4 und F4/80) markiert wurden, aber keine intrazelluläre TNF- α -Färbung durchgeführt wurde, diente als Negativkontrolle. Das Hintergrundsignal der Negativkontrolle im PE-Kanal wurde zur Bestimmung des Anteils TNF- α -positiver Zellen von dem Signal im PE-Kanal von Zellen mit intrazellulärer TNF- α -Färbung subtrahiert. Die Auswertung der via Durchflusszytometrie ermittelten Daten erfolgte mit dem Computerprogramm WinMDI 2.8. In Abb. 2 (siehe S.70) ist die Auswertung zur Bestimmung des Anteils TNF- α -positiver CD4⁺ Zellen in einer Einzelzellsuspension der Milz von aktiv immunisierten Kontrolltieren beispielhaft dargestellt. In einem ersten Schritt wurde in einem Punktdiagramm das Vorwärtstreulicht auf der X-Achse gegen das Seitwärtstreulicht auf Y-Achse aufgetragen, wodurch alle gemessenen

Ereignisse dargestellt werden (Abb. 2 A und Abb. 2 B). Anschließend wurde das Signal im FITC-Kanal gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen. Dadurch kristallisierte sich eine CD4-positive Zellpopulation heraus, die mit einer Ellipse eingrahmt wurde (Abb. 2 B und Abb. 2 E). In einem weiteren Punktdiagramm wurden nur die zuvor durch die Ellipse ausgewählten Zellen dargestellt. Dabei wurde das Signal im FITC-Kanal gegen das Signal im PE-Kanal aufgetragen. Von den eingezeichneten Quadranten gibt der obere, rechte Quadrant den Anteil der CD4+ Zellen an, die positiv für TNF- α sind (Abb. 2 C). Von diesem Anteil wurde der Prozentsatz des oberen, rechten Quadranten der Negativkontrolle (Abb. 2 F) als Hintergrundfluoreszenz subtrahiert.

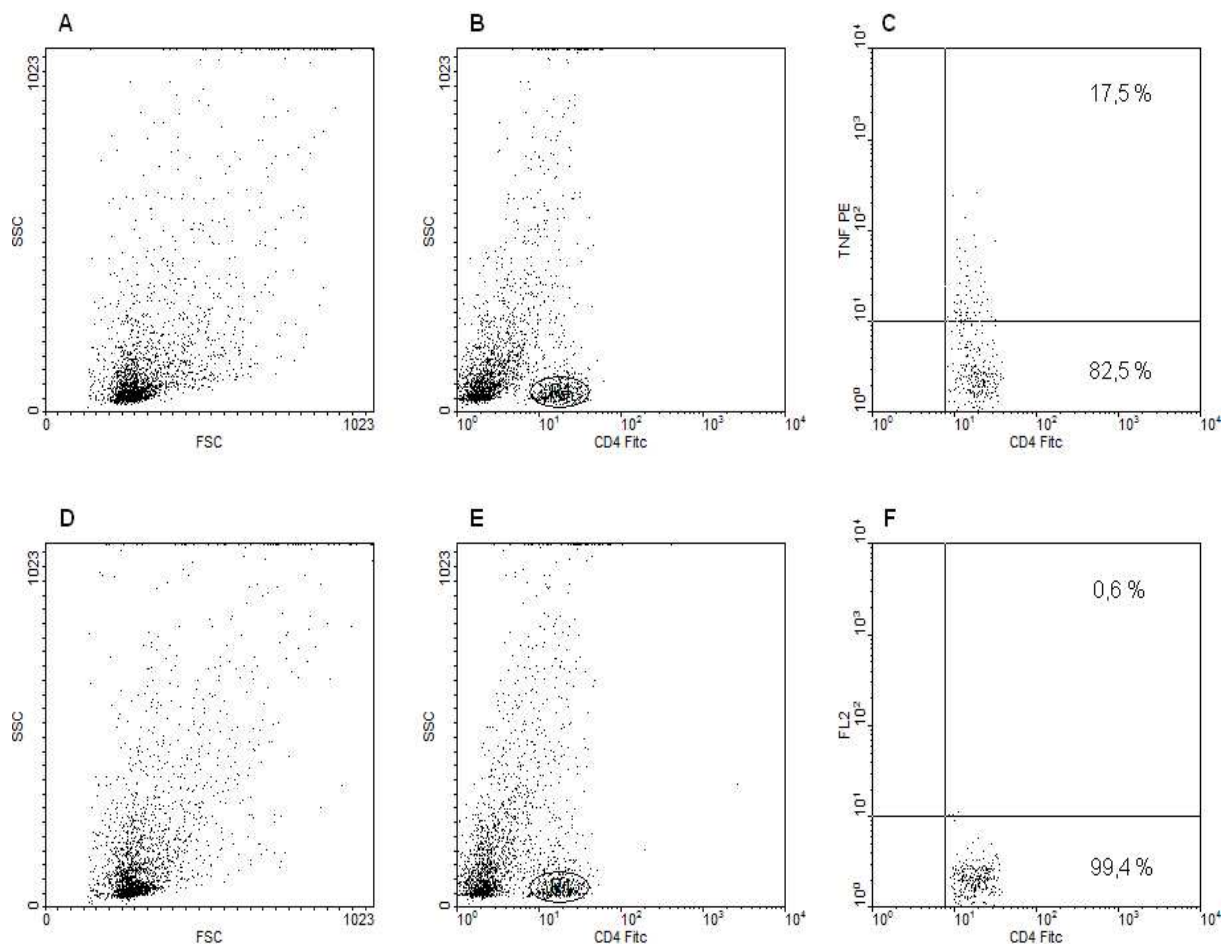


Abb. 2: (A-C) Auswertung durchflusszytometrischer Daten zur Analyse der intrazellulären TNF- α -Färbung von CD4+ Zellen der Milz bei aktiv immunisierten Kontrolltieren. (D-E) Negativkontrolle (ohne PE-gekoppelten Antikörper gegen TNF- α). (A und D) Signal von Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC). (B und E) Signal im FITC-Kanal gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen. CD4-positive Zellpopulation (Ellipse). (C und F) Darstellung der Signale im FITC-Kanal und im PE-Kanal (FL2) der in B bzw. E ausgewählten Zellen. Der obere, rechte Quadrant gibt den Anteil der TNF- α -positiven CD4+ Zellen an.

Die Auswertung zur Ermittlung des Anteils TNF- α positiver F4/80+ Zellen in Einzelzellsuspensionen der Milz erfolgte analog. Dabei wurden in dem Punktdiagramm, in welchem das Signal des Allophycocyanin (APC)-Kanals (Alexa Fluor® 647 strahlt in den APC-Kanal) gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen ist (Abb. 3 B.), mit einem Rechteck alle gemessenen Ereignisse ab einem Fluoreszenzsignal von 10^1 im APC-Kanal ausgewählt und im folgenden Punktdiagramm gegen das Signal im PE-Kanal aufgetragen (Abb. 3 C).

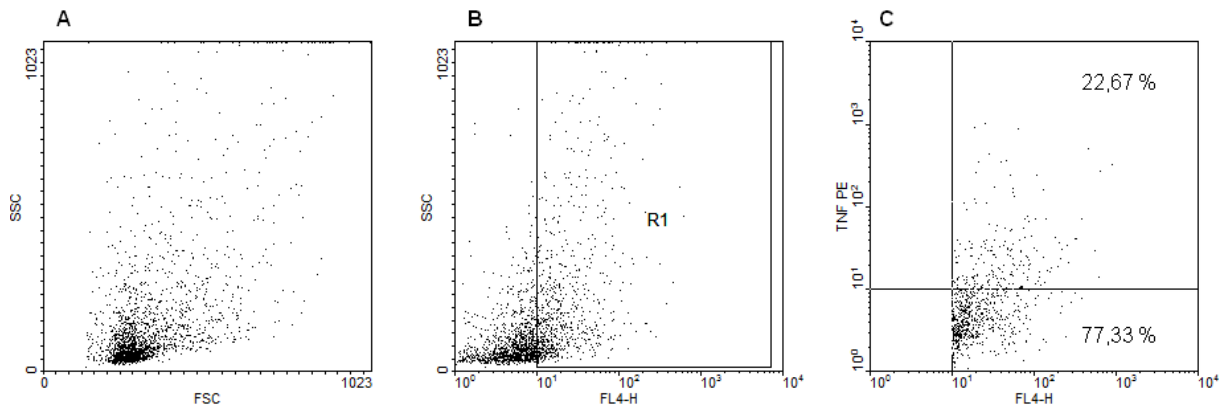


Abb. 3: Auswertung durchflusszytometrischer Daten zur Analyse der intrazellulären TNF- α -Färbung von F4/80+ Zellen der Milz bei aktiv immunisierten Kontrolltieren. (A) Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC). (B) Alexa Fluor® 647-Signal im APC-Kanal (FL4-H), Seitwärtsstreulicht (SSC). F4/80-positive Zellen (R1). (C) Darstellung der durch R1 ausgewählten Zellen. APC-Kanal (FL4-H), PE-Kanal. Der obere, rechte Quadrant gibt den Anteil der TNF- α -positiven F4/80+ Zellen an.

2.2.16 Bestimmung des Zytokingehaltes in den okulären Geweben

2.2.16.1 Präparation der Augen

Zur Bestimmung des Gehaltes verschiedener Zytokine in den okulären Geweben wurden die kompletten Augen unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bindegewebsreste wurden mit einer Pinzette und einer feinen Schere entfernt. Anschließend wurden je ein Auge und 1ml kaltes PBS in einen vorgekühlten Gewebehomogenisator aus Glas gegeben und mechanisch zerrieben. Zum Schutz der Zytokine vor Degradierung wurden dem PBS die Proteinaseinhibitoren Leupeptin (10 μ M), Pepstatin A (1 μ M) sowie Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM) zugesetzt. Das Homogenisat wurde in ein Eppendorf-Gefäß (2 ml) überführt und für 30 Sekunden im Eisbad mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde das Homogenisat für 5 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.16.2 Quantifizierung der Zytokine

Die Konzentration von IL1- α , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-4 und IL-17 im Überstand des Homogenisates eines Auges wurde mithilfe eines Multiplex Bead Assay (Multiplex Kit siehe 2.1.5) bestimmt. Dabei beruht das Prinzip der Quantifizierung auf einer durchflusszytometrischen Analyse, die die simultane Bestimmung der oben aufgeführten Zytokine in einer Probe ermöglicht. Die Durchführung des Multiplex Bead Assay erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers und bis auf A. dest. wurden ausschließlich von dem Kit bereitgestellte Lösungen und Substanzen verwendet. Zunächst wurden 25 μ l einer jeden Probe (Überstand des Homogenisates eines Auges) in ein Greiner-Röhrchen gegeben. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Den Proben wurden 25 μ l einer Mischung aus Mikrokügelchen zugefügt. Diese Mikrokügelchen unterschieden sich durch ihre Spezifität für ein bestimmtes Zytokin und durch ihre Größe. Auf ihrer Oberfläche trugen die Mikrokügelchen Antikörper, die an ein bestimmtes Zytokin binden konnten. Dadurch, dass Mikrokügelchen, die eine Spezifität für das gleiche Zytokin hatten, auch gleich groß waren, konnten bei den späteren Analysen mit dem Durchflusszytometer Populationen von Mikrokügelchen diskriminiert werden, die den unterschiedlichen Zytokinen in einer Probe zugeordnet werden konnten. In einem nächsten Schritt wurden jeder Probe 50 μ l von einer Mischung Biotin-gekoppelter Antikörper zugefügt, die sich wie die Mikrokügelchen in ihrer Spezifität für ein bestimmtes Zytokin unterschieden. Diese Biotin-gekoppelten Antikörper traten spezifisch mit ihrem Ziel-Zytokin in Wechselwirkung, das bereits an die entsprechenden Mikrokügelchen gebunden war. Nach einer Inkubation der Proben mit den Mikrokügelchen und den Biotin-gekoppelten Antikörpern für 2 Stunden bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurden die Proben-Röhrchen mit Assay-Puffer aufgefüllt und anschließend für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Dadurch wurden die Mikrokügelchen mit den gebundenen Zytokinen und Biotin-gekoppelten Antikörpern auf den Grund des Proben-Röhrchens befördert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 100 μ l mit einer Pipette abgenommen. Nach dem Resuspendieren des Restvolumens wurde dieser Waschschriff mit Assay-Puffer noch einmal wiederholt, bevor zu jeder Probe 50 μ l einer PE-gekoppelten Streptavidin-Lösung gegeben wurden. Die einzelnen Proben wurden gut durchmischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, sodass das PE-gekoppelte Streptavidin einen Komplex mit dem Biotin der Antikörper bilden konnte. Durch zwei aufeinander folgende Waschschriffe mit Assay-Puffer wurde überschüssiges, nicht gebundenes PE-gekoppeltes Streptavidin entfernt. Bei der Analyse mit dem Durchflusszytometer erzeugten die für ein bestimmtes Zytokin spezifischen Mikrokügelchen

bei einer hohen Konzentration des entsprechenden Zytokins in der Probe ein starkes Fluoreszenzsignal im PE-Kanal. Wie bei einem ELISA wurde auch bei diesem Multiplex Bead Assay eine Reihe serieller Verdünnungen der rekombinanten Zytokine mit bekannten Konzentrationen (Standardreihe) angefertigt. Der lyophilisierte Standard eines jeden Zytokins wurde in der geforderten Menge an A. dest. gelöst. 10 µl dieser Stocklösung eines jeden Zytokins wurden in ein Greiner-Röhrchen gegeben, was mit Assay-Puffer auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt wurde. Ausgehend von diesem höchst konzentrierten Standard wurde die Verdünnungsreihe angefertigt. Die Auswertung der Daten, die mit dem Durchflusszytometer generiert wurden, erfolgte mit der Software FlowCytomix Pro 2.2. Damit wurde eine Standardkurve erstellt, indem die Zytokinkonzentration der Standardverdünnung auf der X-Achse gegen die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) im PE-Kanal auf der Y-Achse aufgetragen wurde. Mit Hilfe dieser Standardkurve wurde die MFI der unterschiedlichen Mikrokügelchen-Populationen in einer Probe in die Konzentration der entsprechenden Zytokine umgerechnet.

2.2.17 Immunhistochemische Detektion von TNF- α auf Gewebeschnitten von Augen

Die immunhistochemische Färbung von TNF- α erfolgte analog zu dem Protokoll der Immunfluoreszenz-Färbung von GFAP an Gewebeschnitten von fixierten und in Paraffin eingebetteten Augen (siehe Abschnitt 2.2.14.2). Ein Antigen-Retrieval war für den dabei eingesetzten, Paraffin-gängigen Primärantikörper nicht notwendig. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Schweineserum in PBS^S und Fc-Block (1:100) wurden die Gewebeschnitte sogleich mit dem Primärantikörper (Kaninchen Anti-TNF- α , siehe 2.1.2.1.) für 60 Minuten inkubiert. Der Primärantikörper wurde dafür 1:100 verdünnt. Da das Prinzip dieser immunhistochemischen Färbung auf der Umsetzung eines Substrates in ein farbiges Produkt durch eine Peroxidase beruht, wurden die Gewebeschnitte im folgenden Schritt für 10 Minuten in 3 % Wasserstoffperoxid in PBS^S inkubiert, um die Aktivität endogener Peroxidasen zu unterdrücken. Der Biotin-gekoppelte Sekundärantikörper (siehe 2.1.2.2) wurde 1:200 in PBS^S mit 5 % Mausserum verdünnt und für 30 Minuten inkubiert. Für weitere 30 Minuten wurden die Gewebeschnitte mit Streptavidin inkubiert, das an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt war (Streptavidin-HRP). Das Streptavidin-HRP wurde 1:500 in PBS^S verdünnt. Anschließend wurden die Objektträger für mindestens 20 Minuten in eine Küvette mit Substratlösung gegeben. Als Substrat wurden 20 mg 3-Amino-Ethyl-9-Carbazol (AEC) in 5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und zu 95 ml Acetatpuffer gegeben. Die Substratlösung wurde mit 123 µl 30 %igem Wasserstoffperoxid aktiviert. Die

Meerrettichperoxidase setzt das Substrat AEC enzymatisch zu einem rosa-rot farbigen bis rostbraunen Endprodukt um. Da das Streptavidin-HRP an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet, der wiederum an den für das Zielmolekül spezifischen Primärantikörper bindet, findet die Farbreaktion nur dort statt, wo das zu untersuchende Antigen vorkommt. Die immunhistochemische Färbung wurde durch 10-minütige Inkubation mit 4 % Formaldehyd in Acetatpuffer fixiert. Nachdem die Objektträger für 15 Sekunden in 1 %ige Essigsäure gegeben wurden, wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (Gill No. 3 Hämatoxylin) durchgeführt. Nach einer Einwirkdauer von 15 Sekunden wurde überschüssiges Hämatoxylin in A. dest und Leitungswasser abgespült. Die Objektträger wurden für die Untersuchung der immunhistochemischen Färbung und das Vorkommen des Zielmoleküls unter dem Lichtmikroskop mit AquaTex und einem Deckgläschen eingedeckt.

2.2.18 *In vitro* Untersuchungen zur Hemmung der TNF- α -Expression durch ASON an Knochenmarkmakrophagen

Die TNF- α -Inhibition durch ASON wurde *in vitro* durch die Inkubation von stimulierten Knochenmarkmakrophagen mit gegen die mRNA von TNF- α gerichteten ASON oder zur Kontrolle mit KON (siehe Abschnitt 2.2.3.8) bzw. Medium überprüft. Die TNF- α -Expression wurde anschließend anhand von Zelllysaten dieser Knochenmarksmakrophagen im Western Blot untersucht.

2.2.18.1 Gewinnung von Knochenmarkmakrophagen

Aus den Oberschenkelknochen von Mäusen wurde das Knochenmark mit RPMI unter Verwendung einer Einwegspritze und einer 27-G-Kanüle herausgespült. Durch das wiederholte aufziehen und ablassen des RPMI mit einer Pipette wurde eine Einzelzellsuspension der Stammzellen des Knochenmarks erzeugt. Zur Generierung von Makrophagen wurden die Knochenmarkzellen in RPMI-Medium aufgenommen, welchem neben FCS und Ciprofloxacin Kulturüberstände von L929-Zellen (15 % [v/v]) zugefügt wurden (siehe Abschnitt 2.1.9.3). Diese Zellkulturüberstände stammten von L929-Zellen, die für 7 Tage mit RPMI inkubiert wurden und dienten als Quelle für den Makrophagen-spezifischen Entwicklungs- und Differenzierungsfaktor M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, engl. macrophage colony-stimulating factor) (Lee & Wong 1980; Zhang et al. 2008). Die Zellsuspension aus dem Knochenmark wurde in einem 20-ml-Volumen auf Zellkulturschalen aus Polystyren ausgesät und für 5 Tage im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Frühere Experimente haben gezeigt, dass nach Anwendung dieser

Methode 90 % der Knochenmarkzellen positiv für den Makrophagen-Marker F4/80 waren (Bauer et al. 2012).

2.2.18.2 Stimulation der Knochenmarkmakrophagen

Nach der Inkubation der Knochenmarkzellen ließen sich die adhärennten Makrophagen mit gekühltem PBS leicht von der Polystyren-Zellkulturschale ablösen. Die Knochenmarkmakrophagen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Medium aufgenommen, welches auch für L929-Zellen im Bioassay verwendet wurde (siehe Abschnitt 2.1.9.3). Die Knochenmarkmakrophagen wurden in einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in die Vertiefungen einer 12-Felder-Platte ausgesät und für 4 Stunden mit ASON gegen die TNF- α -mRNA (Endkonzentration 10 μ M), KON (Endkonzentration 10 μ M) oder Medium präinkubiert. Zur Stimulation der TNF- α -Expression wurden die Knochenmarkmakrophagen anschließend mit 100 ng/ml LPS sowie 100 U/ml IFN- γ für 24 Stunden inkubiert (Myers et al. 1995).

2.2.18.3 Proteinisolation aus Knochenmarkmakrophagen

Die Zellkulturüberstände der Knochenmarkmakrophagen wurden mit einer Pipette abgenommen und bis zu weiteren Analysen bei -20 °C gelagert. Die Knochenmarkmakrophagen wurden mit Hilfe von kaltem PBS und eines Zellschabers vom Grunde der 12-Felder-Zellkulturplatten abgelöst, in ein 15-ml-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 486 x g zentrifugiert. Für die Lysierung der Zellen und das Herauslösen der Proteine wurde das Zellpellet anschließend in 200 μ l RIPA-Puffer mit Proteinasehemmern (1 μ M Pepstatin A, 100 μ M Leupeptin, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) aufgenommen und mit Hilfe einer Einwegspritze sowie einer 20-G-Kanüle resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurden die nun lysierten Zellen mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Zelllysate für 5 Minuten bei 13800 x g zentrifugiert. Die Überstände der lysierten Zellen wurden bis zur Analyse im Western Blot bei -20 °C gelagert.

2.2.18.4 Western Blot

Für die Auftrennung der Proteine aus den Zelllysaten wurde ein Gel mit 15 % Acrylamidgehalt gegossen. Das Trenngel wurde mit A. dest. überschichtet und über Nacht im Kühlschrank gelagert bevor das Sammelgel darüber geschichtet wurde. In das Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, der nach der Polymerisation des Gels wieder herausgezogen werden konnte und Taschen für die Beladung des Gels mit den Zelllysatsproben hinterließ. Je

eine Geltasche wurde mit 25 µg Protein einer Zelllysatsprobe beladen. Der Proteingehalt der Proben wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Proteintest (siehe Abschnitt 2.1.5) bestimmt, der gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Der Proteintest basierte auf der Reaktion der Proteine mit einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung und einer anschließenden Reduktion eines Folin-Reagens (Lowry et al. 1951). Die Intensität der Farbentwicklung in den Vertiefungen einer 96-Felder-Nunc-ImmunoTM-Platte, anhand derer sich die Proteinkonzentration einer Probe errechnen ließ, wurde mit Hilfe eines Achtkanalphotometers gemessen. Vor der Beladung des Gels wurden die Zelllysatsproben zusammen mit einem zugefügten Ladepuffer für 10 Minuten bei 98 °C aufgeköcht. Dadurch wurden die Proteine denaturiert und mit einer gleichmäßigen Ladung versehen, um sie bei der späteren Elektrophorese der Größe nach auftrennen zu können. Der Ladepuffer hatte zudem die Funktion, dass die Proben bis an den Grund der Geltaschen sanken. Zunächst wurde an die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreseeinheit eine Spannung von 90 V angelegt. Nachdem die Lauffront der Proteinproben das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Der Transfer der im Trenngel separierten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte bei 350 mA über eine Dauer von 45 Minuten. Der dafür in das Blotmodul gefüllte Transferpuffer wurde während des Transfers gekühlt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert. Das BSA wurde in TBS-T gelöst (5 % BSA/TBS-T). Anschließend wurde die Membran mehrmals mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit einem Anti-TNF- α -Antikörper (siehe Abschnitt 2.1.2.1) über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Um zu überprüfen, ob von den verschiedenen Zelllysatsproben grundsätzlich gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde eine zweite Membran mit einem primären anti- β -Aktin Antikörper inkubiert. Die Primärantikörper wurden 1:1000 in 2,5 % BSA/TBS-T verdünnt. Auf die Primärantikörper folgend wurden die Membranen nach erneutem Waschen für 1 Stunde mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Abschnitt 2.1.2.2) inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde 1:4000 in 2,5 % BSA/TBS-T verdünnt. Überschüssige Sekundärantikörper wurden in folgenden Waschschritten entfernt. Die Detektion der an das Zielprotein gebundenen Antikörper erfolgte durch Streptavidin-HRP und „Super Signal“ als Substrat. Das Streptavidin-HRP wurde in einer 1:10000-Verdünnung in 2,5 % BSA/TBS-T für 1 Stunde auf die Membranen gegeben. Anschließend wurden die Membranen sechsmal für 5 Minuten gewaschen, bevor sie für 5 Minuten mit „Super Signal“ (Komponente A und Komponente B in gleichen Volumenanteilen) beschichtet wurden. Das Streptavidin-HRP katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion des Substrates, die durch die

Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wurde. Dazu wurden die Membranen in eine handelsübliche Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Dunkelkammer mit dem Röntgenfilm in einer Filmkassette platziert. Nach einer Expositionszeit von etwa 30 Minuten erfolgte die Entwicklung des Röntgenfilms. Dazu wurde der Röntgenfilm sukzessive in eine Schale mit Entwicklerlösung, Fixierlösung und Leitungswasser getaucht. Die Stelle, an der der Primärantikörper an Protein auf der Membran bindet, wird nach der Entwicklung als geschwärzte Bande auf dem Röntgenfilm sichtbar. Zur Kontrolle der Position der Bande des Zielproteins wurde auf eine Bahn eines Gels ein Proteinmarker geladen. Der Proteinmarker enthält eine Mischung aus gefärbten Proteinen verschiedener, definierter Größe. Die Marker-Proteine sind nach dem Transfer als farbige Banden auf der Membran sichtbar.

2.2.19 Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS 15.0 bzw. SPSS/PASW Statistics 18. Für normal verteilte Daten wurden parametrische Tests durchgeführt. Dabei wurde für den Vergleich von zwei Gruppen ein t-Test und für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen eine Varianzanalyse (oneway ANOVA) mit Tukey post Hoc Analysen durchgeführt. Bei nicht normal verteilten Daten wurde für den Vergleich mehrerer Gruppen ein Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Für die Analyse von Daten zum EAU-Schweregrad wurde als nichtparametrischer Test ein Mann-Whitney-U-Test angewendet. Rohdaten sind im Ergebnisteil in Form von Mittelwerten und Standardabweichungen ($MW \pm STD$) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Ergebnisse zur Auslösung des EAU-Modells und der intravitrealen Injektionen

3.1.1 Auslösung des EAU-Modells

Mit der subkutanen Injektion von 100 µg IRBPp161-180 in Emulsion mit CFA sowie einer zusätzlichen intraperitonealen Gabe von 0,4 bis 0,5 µg PTX wurde ein Immunisierungsschema etabliert, wodurch das EAU-Modell zuverlässig und reproduzierbar ausgelöst werden konnte (Hennig 2012). Obwohl für den B10.RIII-Mausstamm eine erfolgreiche EAU-Induktion ohne die Verwendung von PTX beschrieben wurde (Silver et al. 1999), konnte in diesen Versuchsreihen eine Uveitis ohne PTX nicht zuverlässig ausgelöst werden. Die Injektion von 0,4 bis 0,5 µg PTX stellte sich als die geringste Dosis heraus, mit der sich das Modell reproduzierbar auslösen ließ. Bei höheren PTX-Dosen stieg die Anzahl von Fällen systemischer Nebenwirkungen mit letalen Folgen. In der Literatur ist zudem die Behandlung der IRBP/CFA-Emulsion mit Ultraschall vor der Immunisierung der Tiere beschrieben (Agarwal & Caspi 2004). Durch die Anwendung dieser Methode bekam die Emulsion eine zähe cremartige Konsistenz. Die ultraschallbehandelte Emulsion war auch drei Wochen nach der subkutanen Injektion noch als eine Art Depot unter der Haut vorhanden und löste eine sehr starke EAU aus. Ein hoher Anteil der Tiere wies eine extreme und vollständige Zerstörung der gesamten Netzhaut auf, was die Wahrscheinlichkeit einer Besserung durch eine etwaige therapeutische Intervention reduziert. Daher wurde in den folgenden Experimenten keine Ultraschallbehandlung der Emulsion vorgenommen. Durch das hier angewendete Immunisierungsschema konnte das gesamte Spektrum der unter Abschnitt 2.2.7.3 aufgeführten Charakteristika zur Beurteilung des Uveitisgrades nach Caspi et al. beobachtet und reproduziert werden. Bei leichten Entzündungserscheinungen wurde im histologischen Gewebeschnitt eine Infiltration von einzelnen Zellen in die Retina und den Glaskörper beobachtet. Auch ein vermehrtes Einwandern von Entzündungszellen aus den in der Ganglienzellschicht der Retina gelegenen Blutgefäßen (perivaskuläre Infiltration) war typisch für einen leichten Entzündungsgrad (Abb. 4 B; siehe S.79). Bei einem schwereren Entzündungsgrad traten fokale Läsionen auf, die mit der Degeneration von Photorezeptoren verbunden waren. Diesbezüglich konnte in den entsprechenden Bereichen der Netzhaut eine Reduktion der Zellkerne besonders in der äußeren Körnerschicht der Retina beobachtet werden. Zudem zählten bei einem schwereren Entzündungsgrad die Bildung von Granulomen (Abb. 4 D; siehe S. 79) und kleinflächige, mit Einblutungen und Faltungen verbundene Netzhautablösungen zu den häufigen Beobachtungen. Bei besonders schwerem Verlauf

konnte eine weitestgehende Ablösung der Netzhaut sowie die Zerstörung aller ihrer Schichten beobachtet werden. Gerade in den Bereichen, wo die äußeren Segmente der Photorezeptoren der Netzhaut liegen, wurde ein sehr dichtes und großflächiges Vorkommen von Entzündungszellen (Abb. 4 C) beobachtet. Teilweise kam es zur Bildung von Gefäßen in diesem Entzündungsgewebe oder in der darunterliegenden Schicht retinaler Pigmentepithelzellen (Abb. 4 E). Auch die Bildung granulomatöser Strukturen, die sich von der Choroidea bis in die Retina erstreckten (Dalen-Fuchs-Knoten), trat häufig auf (Abb. 4 F). Im schwersten Falle war die retinale Architektur vollständig zerstört, wobei das Netzhautgewebe durch entzündliches und fibrotisches Gewebe ersetzt war.

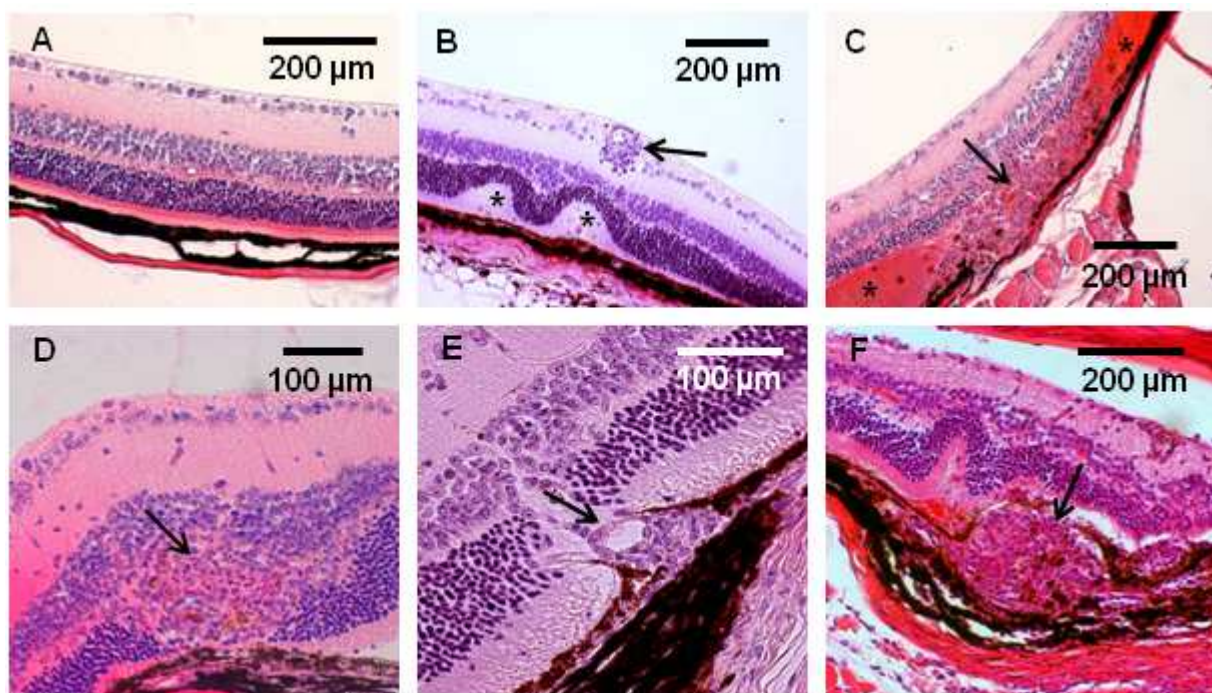


Abb. 4: Histologischer Schnitt vom Mausauge mit Hämatoxylin- und Eosin-Färbung. (A) Gesunde Retina. (B) Leichte Retinafaltung (*) und perivaskuläre Infiltration (Pfeil). (C) Exudative Netzhautablösung (*) und Entzündungsinfiltrat (Pfeil). (D) Granulom (Pfeil). (E) Subretinale (Pfeil) und intraretinale Neovaskularisation. (F) Dalen-Fuchs-Knoten (Pfeil).

Bei der klinischen Beurteilung wurde dem Auge entsprechend der Anzahl und Größe von Läsionen, die sich bei funduskopischer Untersuchung vom Augenhintergrund abgrenzen, sowie dem Vorkommen von Gefäßleckagen und Einblutungen ein klinischer Entzündungsgrad von 0 bis 4 zugeordnet. Ein vereinzeltes Vorkommen fokaler Läsionen, die als kleine weiße Punkte oder Bänder auf dem silbrig-grauen Augenhintergrund zu erkennen

waren, wurde als leichter klinischer Entzündungsgrad von 0,5 bis 1 gewertet. Bei einem klinischen Grad von 2 waren viele fokale Läsionen über den gesamten Augenhintergrund verteilt. Mit steigendem Entzündungsgrad wurden die Läsionen großflächiger und zusätzliche Gefäßleckagen bzw. Einblutungen in oder unter die Retina konnten beobachtet werden. Der klinische Entzündungsgrad approximierte in der Regel den später ermittelten histologischen Entzündungsgrad (Abb. 5; siehe S. 81). Bei der funduskopischen Beurteilung konnten keine einzelnen Entzündungszellen, die in das Netzhautgewebe oder die okularen Flüssigkeiten von Vitreus und Vorderkammer eingewandert sind, detektiert und wie bei der histopathologischen Beurteilung als geringfügiger Entzündungsgrad gewertet werden. Vielmehr stellte sich ein Entzündungsinfiltrat in den okularen Flüssigkeiten als eine Trübung im Auge dar. Während der Phase, in der die aktive Entzündung ihren Höhepunkt hatte, war das Infiltrat in den okularen Flüssigkeiten bzw. die Trübung im Auge mitunter so stark, dass der Augenhintergrund mittels Funduskopie nicht betrachtet werden konnte. Im weiteren Verlauf der EAU nahm das zelluläre Infiltrat wieder ab, während strukturelle Zerstörungen bzw. pathologische Veränderungen am Augenhintergrund erhalten blieben und beurteilt werden konnten. Der durchschnittliche klinische Entzündungsgrad einer Versuchsgruppe lag häufig leicht über dem histologischen Entzündungsgrad. Das ist darauf zurückzuführen, dass bei der klinischen Fundusuntersuchung einzelne Läsionen des gesamten Augenhintergrunds in die Bewertung einfließen, die von den ausgewählten Gewebeschnitten aus den unterschiedlichen Ebenen des Auges zur histologischen Beurteilung möglicherweise nicht erfasst wurden. Durch die Betrachtung des Augenhintergrundes konnte ein erster Eindruck vom Ausmaß der Entzündung gewonnen werden, der als Kontrolle und Abgleich herangezogen werden konnte, um die verlässlicheren histologischen Daten zu untermauern. Zudem konnten durch die nicht invasive Methode der Funduskopie Spendertiere für den adoptiven Transfer uveitogener Lymphozyten ausgewählt werden, die deutliche klinische Anzeichen einer EAU aufwiesen.

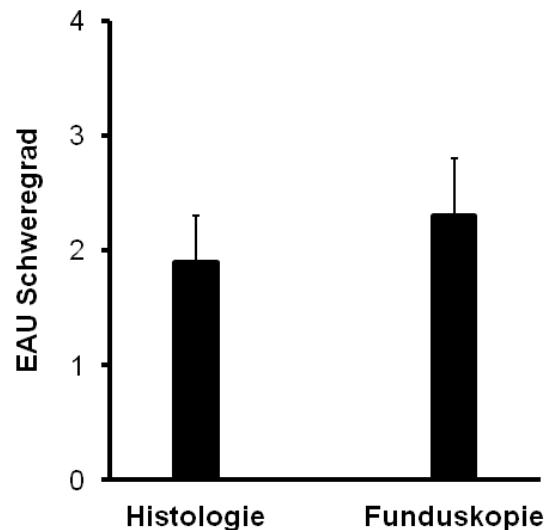


Abb. 5: EAU-Schweregrad aktiv immunisierter Kontrolltiere (intraperitoneale PBS-Injektion in der afferenten Phase) nach histologischer (Tag 21 p.I.) und funduskopischer (Tag 18 p.I.) Beurteilung.

3.1.2 Etablierung der intravitrealen Injektionen

Ein erster Ansatz, 2 µl eines Wirkstoffes in den Glaskörperraum zu injizieren, bestand darin, das entsprechende Volumen mit einer fein ausgezogenen Mikroelektrode aus Glas per Kapillarkraft aufzuziehen und nach Punktion des Auges mit Hilfe eines Drucksystems durch Luftdruck in den Glaskörper zu spritzen. Bei einer zweiten Methode wurde das Volumen mit einer 10 µl fassenden Hamilton-Spritze aufgezogen und unter Verwendung einer 33-G-Kanüle intravitreal appliziert.

Die Glaskapillare bot im Vergleich zur 33-G-Kanüle einen geringeren Durchmesser. Die Glaskapillaren werden jedoch derart fein ausgezogen, dass diese am Ende verschlossen sind. Um den Wirkstoff in die Kapillare aufziehen und anschließend injizieren zu können, muss die Spitze der Kapillare zunächst mit einer Pinzette abgebrochen werden. Dadurch sind die Injektionskapillaren stets etwas unterschiedlich gestaltet. Es kann sich eine scharfe Bruchstelle bilden, mit der sich leicht durch die Sklera in das Augeninnere eindringen lässt. In anderen Fällen bildete sich eine glattere und stumpfere Bruchstelle. Mit Verwendung der von Hamilton gefertigten 33-G-Kanülen wurden diesbezüglich standardisierte Bedingungen geschaffen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Hamilton-Spritze und Kanüle war, dass die Injektionen durch eine einzelne Person alleine durchgeführt werden konnten. Die lange und flexible 33G-Kanüle wurde etwa 12 mm vor dem Schliff mit Daumen und Zeigefinger festgehalten. Die Spritze wurde auf den Handrücken gelegt. Nach Einführen der Kanüle in das

Auge konnte mit der linken Hand, mit der zuvor die Maus fixiert wurde, der Spritzenkolben vorgeschoben und so das entsprechende Volumen injiziert werden. Bei Verwendung des Drucksystems musste nach Einführen der Glaskapillare in das Auge eine zweite Person den Kolben der luftgefüllten 50-ml-Spritze vordrücken, um den Wirkstoff per Luftdruck aus der Kapillare in das Auge zu spritzen. Die Glaskapillare musste sofort, nachdem der Wirkstoff appliziert war, aus dem Auge herausgezogen werden, da sonst die Gefahr bestand, Luft in das Auge zu pumpen, woraufhin die Mäuse augenblicklich verstarben. Daher war die Sterberate bei intravitrealen Injektionen mit dem Drucksystem höher als bei Verwendung von μ l-Spritze und 33-G-Kanüle. Zudem zog sich Flüssigkeit und damit ein Teil des Wirkstoffes wieder durch Kapillarkräfte in der Glaskapillare hoch, sofern diese nicht umgehend nach Entlassen des Volumens wieder aus dem Auge entfernt wurde. Damit war die exakte Applikation eines definierten Volumens mit dem Drucksystem ungenauer als mit der μ l-Spritze/33-G-Kanüle. Dies könnte jedoch möglicherweise dadurch kompensiert werden, dass durch den größeren Durchmesser einer 33-G-Kanüle im Vergleich zur Glaskapillare eine größere Verletzung am Auge verursacht wird und ein stärkerer Rückfluss von okulären Flüssigkeiten und Wirkstoff durch den Injektionskanal in das umliegende Bindegewebe bzw. in die Konjunktiva vorliegt. Bei beiden Applikationsmethoden war die Traumatisierung des Gewebes relativ eng auf die Injektionsstelle begrenzt. Im Bereich der Injektionsstelle konnte eine leichte Zellinfiltration beobachtet werden. Eine weiterreichende Entzündungsreaktion, die auch von der Injektionsstelle entfernte Netzhautbereiche betraf, konnte histologisch nicht festgestellt werden.

3.2 Proliferation von isolierten Zellen aus der Milz und den submandibulären Lymphknoten aktiv immunisierter Mäuse

Da ein wesentliches Ziel dieser Arbeit die Untersuchung des Effekts einer lokalen TNF- α -Inhibition auf die Entzündungsreaktion und zugrundeliegende Immunmechanismen war, wurden Zellen der submandibulären Lymphknoten als lokale, abführende Lymphknoten des Auges im Proliferationstest untersucht. Bei aktiv immunisierten Mäusen, die lokal mit einer Kontrolllösung (PBS) behandelt wurden, zeigten antigenspezifisch stimulierte Zellen der lokalen, drainierenden Lymphknoten keine erhöhte Proliferation im Vergleich zu Lymphknotenzellen, die ausschließlich mit Medium inkubiert wurden. Bei einer unspezifischen Stimulation der Lymphknotenzellen mit dem Mitogen ConA war die Proliferation gegenüber nicht oder antigenspezifisch stimulierten Lymphknotenzellen signifikant erhöht (Abb 6 A; siehe S. 83). Proliferationstests von Zellen aus der Milz aktiv

immunisierter Kontrolltiere ergaben hingegen auch nach antigenspezifischer Stimulation eine deutliche Erhöhung der Proliferation im Vergleich zu nicht stimulierten Milzzellen. Darüber hinaus war die Proliferation von Milzzellen nach der Stimulation mit ConA noch einmal erhöht (Abb 6 B).

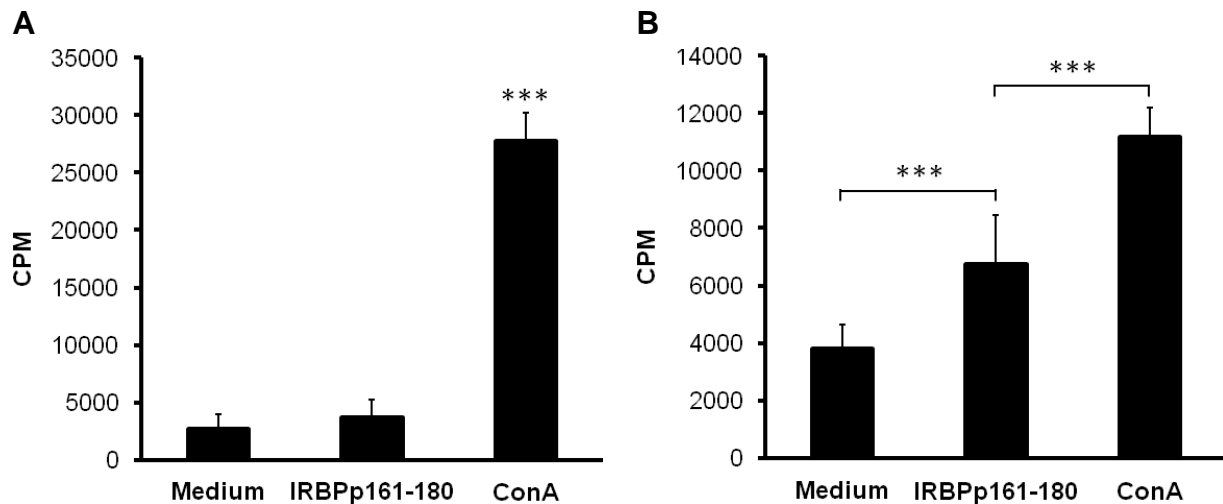


Abb. 6: (A) Proliferation submandibulärer Lymphknotenzellen ohne Stimulation (Medium), nach antigenspezifischer Stimulation mit IRBPp161-180 oder nach unspezifischer Stimulation mit ConA (Medium: CPM=2669 \pm 1339; IRBPp161-180: CPM=3700 \pm 1563; ConA: CPM=27729 \pm 2501). Keine erhöhte Proliferation nach antigenspezifischer Stimulation gegenüber der Negativkontrolle (ANOVA mit Tukey post Hoc Analyse: $p=0,523$). Signifikant erhöhte Proliferation nach Stimulation mit ConA gegenüber IRBPp161-180 und der Negativkontrolle (ANOVA mit Tukey post Hoc Analyse: jeweils $p<0,001^{***}$).

(B) Proliferation von Milzzellen (Medium: CPM=3815 \pm 844; IRBPp161-180: CPM=6747 \pm 1717; ConA: CPM=11190 \pm 988). Signifikant erhöhte Proliferation nach antigenspezifischer Stimulation gegenüber der Negativkontrolle und signifikant geringere Proliferation gegenüber der Positivkontrolle ConA (ANOVA mit Tukey post Hoc Analyse: $p<0,001^{***}$).

Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Proliferationstests von aktiv immunisierten und intraperitoneal mit PBS injizierten Mäusen. Die Lymphknoten bzw. Milzen mehrerer Tiere wurden vereint.

Lymphknotenzellen zeigten keine gesteigerte antigenspezifische Proliferation im Vergleich zur Medium-Kontrolle. Zudem zeigten sich keine konsistenten Unterschiede in der unspezifischen Proliferation von Lymphozyten nach Stimulation mit ConA zwischen mit Wirkstoff behandelten Tieren und entsprechenden Kontrolltieren. Für den Vergleich der

antigenspezifischen Proliferation von Lymphozyten von Mäusen nach der Behandlung mit Wirkstoff oder der Kontrolllösung wird im Folgenden die antigenspezifische Netto-Proliferationsantwort (Δ CPM) von Milzzellen dargestellt. Dabei ist die Basis-Proliferation der Milzzellen nach Inkubation ohne weitere Stimulation von der Proliferation nach antigenspezifischer Stimulation subtrahiert.

3.3 *In vitro* Experimente zur Blockade von murinem TNF- α durch Etanercept

Die Fähigkeit des humanisierten Wirkstoffes Etanercept, auch murines TNF- α zu blockieren, wurde mit Hilfe eines TNF- α -Bioassays an L929-Zellen überprüft.

Nach Inkubation der L929-Zellen mit der höchsten gewählten Konzentration des TNF- α -Standards (55 U/ml) war ein großer Anteil (80% bis 95%) der Zellen tot. Als tote Zellen wurden Zellen gewertet, die eine anormale runde Form mit einer rauen, runzeligen Oberfläche sowie einem ausgefranstem Rand aufwiesen (Abb. 7 A.). Bei einer stärkeren Vergrößerung konnte teilweise eine Blasenbildung der Zellen beobachtet werden (Abb. 7 B.), was auch als Blebbing bezeichnet wird und auf den lysierenden und Apoptose-induzierenden Effekt von TNF- α auf die Zellen zurückzuführen ist. Wurden die L929-Zellen neben TNF- α zusätzlich mit 50 μ g Etanercept inkubiert, traten nur ganz vereinzelt tote Zellen auf. Der überwiegende Anteil der Zellen war adhärent und wies mit unregelmäßigen Fortsätzen eine für Fibroblasten typische Morphologie auf (Abb. 7 C.). Auch die Zellen der Kontrolle, die ausschließlich mit RPMI- und Actinomycin D inkubiert wurden, waren überwiegend vital und bildeten einen dichten Zellrasen (Abb. 7 D).

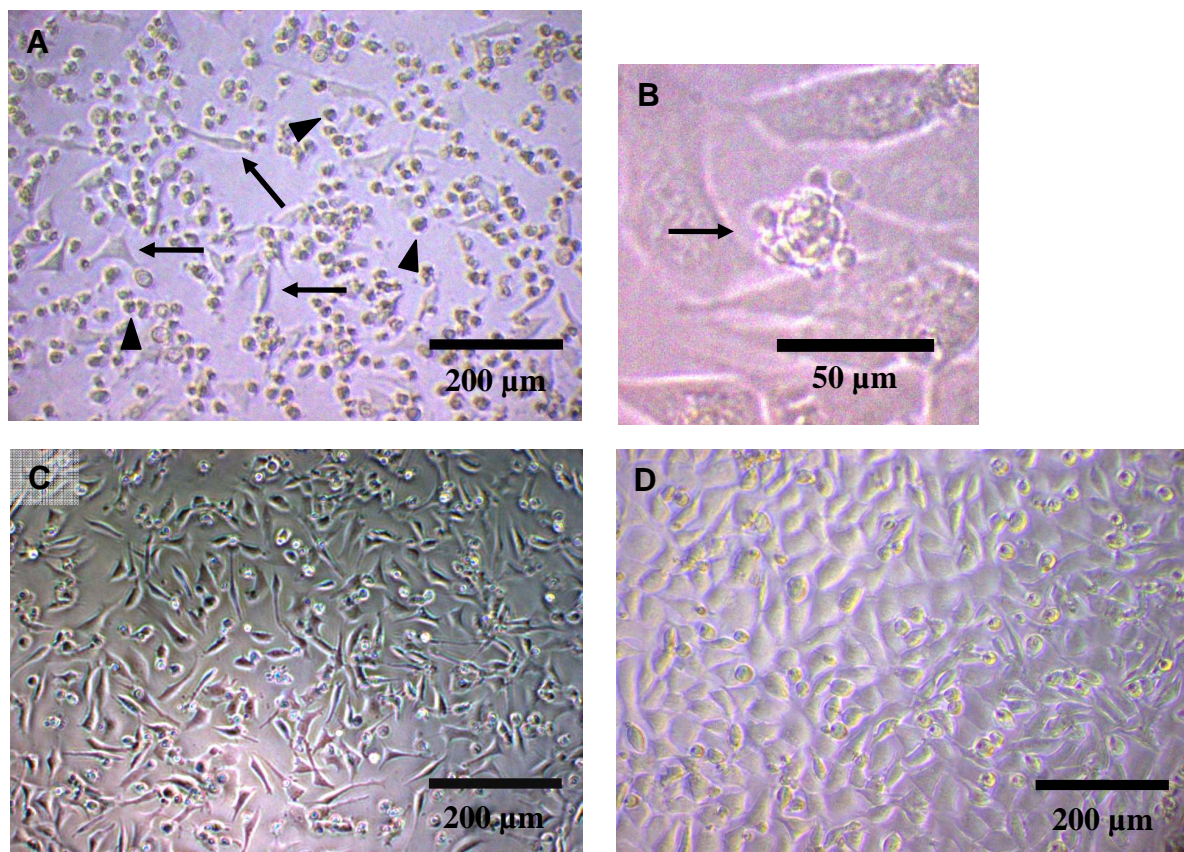


Abb. 7: L929-Zellen im TNF- α Bioassay. (A) Hoher Anteil toter Zellen (Dreieck) nach Inkubation mit TNF- α (55 U/ml); vitale Zellen (Pfeil). (B) „Blebbing“ einer Zelle (Pfeil). (C) Vitale Zellen nach Inkubation mit TNF- α (55 U/ml) und Etanercept (500 μ g/ml). (D) Dichter Zellrasen vitaler Zellen in der Kontrolle (Inkubation mit RPMI und Actinomycin D).

Bei einer seriellen Verdünnung des TNF- α -Standards konnte mit etwa 14 bis 28 U/ml die TNF- α -Konzentration detektiert werden, bei der 50 % der L929-Zellen vital bzw. tot waren (Abb. 8 A). Bei einer gleich bleibenden Konzentration von TNF- α (55 U/ml), aber einer seriellen Verdünnung von Etanercept, lag dieser Umschlagpunkt bei einer Etanercept-Konzentration von 0,5 μ g/ml (Abb. 8 B).

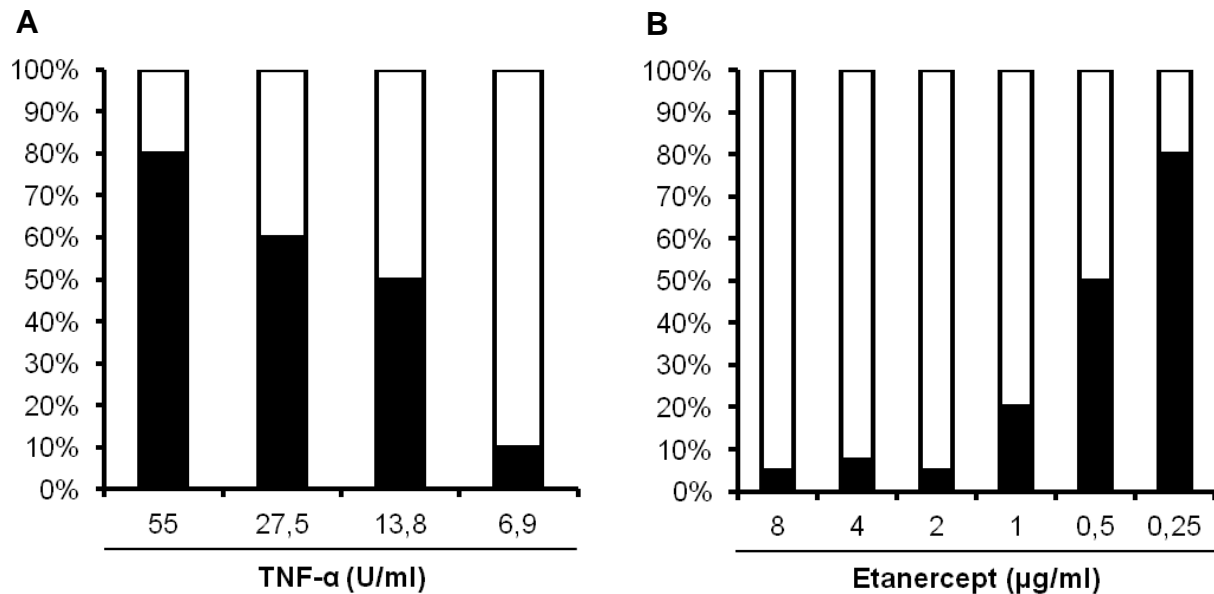


Abb. 8: Anteile vitaler (\square) und toter (\blacksquare) L929-Zellen. (A) Inkubation der Zellen mit TNF- α einer seriellen Verdünnungsreihe. (B) Inkubation der Zellen mit TNF- α (55 U/ml) und Etanercept in absteigender Konzentration.

Nach 15 bis 16 Stunden Inkubation mit TNF- α und Etanercept waren die Zellen bis zu einer Etanercept-Konzentration von 2 μ g/ml überwiegend vital und es traten nur ganz vereinzelt tote Zellen auf (Abb. 8 B.). Demnach konnten 2 μ g/ml Etanercept die biologische Aktivität von 55 U/ml murinem TNF- α effektiv blockieren. Nach einer weiteren Inkubation der Zellen für etwa 9 Stunden konnte ein höherer Anteil toter Zellen bei dieser Etanercept-Konzentration beobachtet werden. Dies impliziert eine transiente Blockade der biologischen Aktivität von TNF- α durch Etanercept.

3.4 Systemische Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU

3.4.1 Histopathologische Beurteilung des Entzündungsgrades

Zur systemischen Behandlung in der afferenten Phase wurde den Mäusen 200 µg Etanercept intraperitoneal an den Tagen -1, 1, 3 und 5 nach der Immunisierung injiziert. Als Kontrolle wurde einer Gruppe von Mäusen zu den entsprechenden Zeitpunkten PBS intraperitoneal gegeben. An Tag 21 nach der Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Augen entnommen. Die histopathologische Beurteilung und Bestimmung des Entzündungsgrades erfolgte anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten Formalin-fixierter und in Paraffin eingebetteter Augen. Von 17 mit Etanercept behandelten Mäusen entwickelten 10 Mäuse eine Uveitis mit Entzündungsmerkmalen, die bei der histopathologischen Beurteilung des Auges mindestens mit 0,5 bewertet wurden. Bei der Kontrollgruppe entwickelten 18 von 21 Mäusen eine Uveitis. Damit lag kein statistisch signifikanter Unterschied in der Inzidenz der Erkrankung zwischen Etanercept behandelten Mäusen und Kontroll-Mäusen vor (χ^2 -Test: $p=0.061$), allerdings eine Tendenz zu einer reduzierten Inzidenz nach systemischer Etanercept-Applikation in der afferenten Phase. Der Unterschied in der Schwere des Entzündungsgrades war hingegen hochsignifikant. Die mit Etanercept behandelten Mäuse wiesen leichte Entzündungszeichen auf, wie Infiltrationen von Entzündungszellen in Retina und Glaskörper, insbesondere perivaskuläre Infiltrationen, während Kontroll-Mäuse einen signifikant höheren EAU-Schweregrad hatten. Dabei waren Netzhautfaltungen, leichte exudative Netzhautablösungen und fokale Läsionen in der Retina häufige Eigenschaften (Abb. 9 A-C; siehe S. 88). Die angegebenen Daten entsprechen den zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten, wo jeweils eine Reduktion des Entzündungsgrades in der Etanercept-Gruppe beobachtet werden konnte. Diese beiden Versuchsreihen hatten eine generell mildere Modellinduktion gemein. Auch Tiere der Kontrollgruppen entwickelten relativ moderate Entzündungszeichen. In einem weiteren Experiment mit gleichem Behandlungsschema, wo die Modellinduktion stärker war und generell ein höherer Entzündungsgrad ausgelöst wurde, hatte die Etanercept-Behandlung keinen reduzierenden Einfluss auf die EAU (Etanercept-Gruppe: $N=22$; Score= $2,5 \pm 0,866$; PBS-Gruppe: $N=14$; Score= $2,7 \pm 0,816$; Mann-Whitney-U-Test: $p=0,494$).

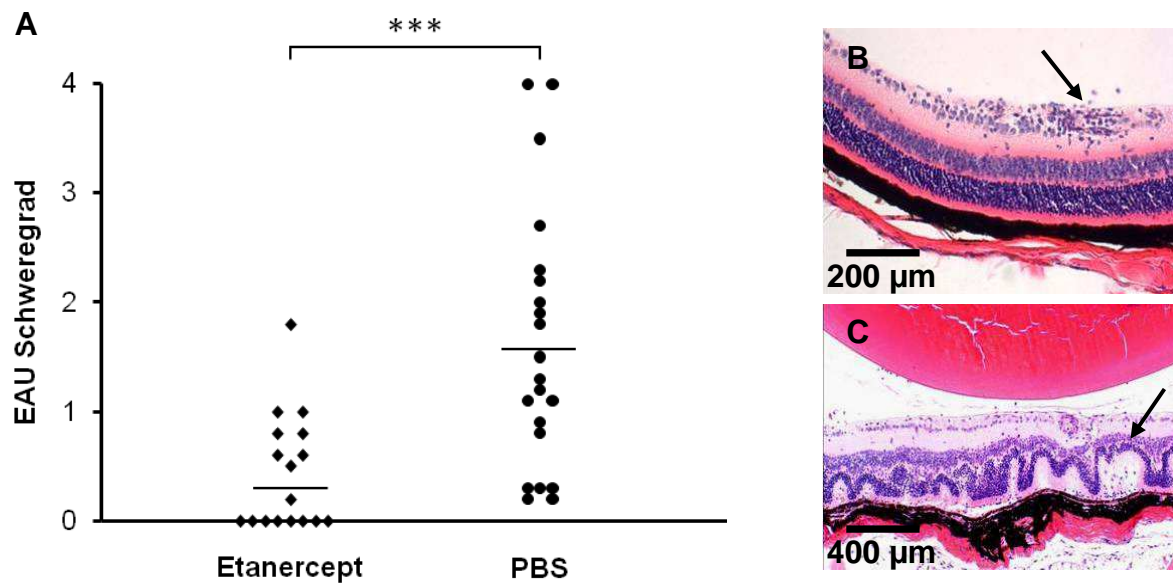


Abb. 9: Histologische Beurteilung des EAU-Schweregrades nach systemischer Etanercept-Behandlung in der afferenten Phase. (A) Reduzierter EAU-Schweregrad in der Etanercept-Gruppe (Etanercept: N=17; EAU-Schweregrad= $0,4 \pm 0,5$; PBS: N=22; EAU-Schweregrad= $1,6 \pm 1,2$; Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001^{***}$). (B) Repräsentativer Gewebeschnitt der Retina nach Etanercept-Behandlung mit perivaskulärer Infiltration (Pfeil). (C) Repräsentativer Gewebeschnitt der Kontroll-Gruppe mit typischen Netzhautfaltungen (Pfeil).

3.4.2 Proliferationstest von Milzzellen

Zur Untersuchung der antigenspezifischen T-Zell-Antwort nach systemischer Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase wurden Einzelzellsuspensionen von Zellen aus der Milz im Proliferationstest untersucht. Die Zellen wurden zur antigenspezifischen Stimulation mit IRBPp161-180 inkubiert. Nicht stimulierte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Zur Darstellung der antigenspezifischen Netto-Proliferation wurde die Basisproliferation nicht stimulierter Milzzellen von der Proliferation antigenspezifisch stimulierter Milzzellen subtrahiert (Δ CPM). Wie die Aufnahme von [3 H]-Thymidin im Proliferationstest zeigte, ging die in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Reduktion des EAU-Schweregrades mit einer signifikant verringerten antigenspezifischen Proliferation von Milzzellen bei der Etanercept-Gruppe einher (Abb. 10; siehe S. 89).

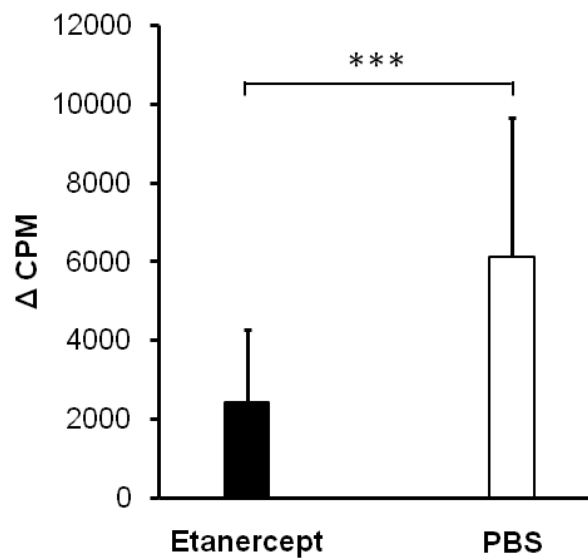


Abb. 10: Signifikant reduzierte IRBPp161-180 spezifische Proliferation von Milzzellen nach systemischer Etanercept-Behandlung in der afferenten Phase (Etanercept: Δ CPM=2428 \pm 1848; PBS: Δ CPM=6136 \pm 3521; t-Test: $p < 0,001^{***}$). Die Milzzellen von Tieren einer Behandlungs-Gruppe wurden vereint. Die dargestellten Daten entsprechen den zusammengelegten Daten von zwei unabhängigen Experimenten.

3.4.3 Zytokingehalt von Zellkulturüberständen der Milz

Nach der systemischen Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase konnte tendenziell eine Reduktion der antigenspezifischen Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine durch Milzzellen beobachtet werden. Wie beim Proliferationstest auch wurde zur Darstellung der antigenspezifischen Nettoproduktion die Basiskonzentration des jeweiligen Zytokins im Zellkulturüberstand nicht stimulierter Zellen von der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand IRBPp161-180-stimulierter Zellen subtrahiert. Der Nettogehalt an IL-2 war in der Etanercept-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um 37 % reduziert. Für den Nettogehalt an IFN- γ betrug die Reduktion in der Etanercept-Gruppe 47 %. Die Konzentration von IL-6 war in dieser Behandlungsgruppe um 42 % und die Konzentration von IL-17 um 45 % verringert. Da auch hierbei die Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit gleichem Trend der Ergebnisse zusammengefasst wurden, lagen relativ hohe Standardabweichungen in der Nettokonzentration der Zytokine vor. Nur bei IL-2 erreichte der Unterschied in der antigenspezifischen Zytokinproduktion zwischen den Behandlungsgruppen das statistische Signifikanzniveau (Abb. 11; siehe S. 90).

Bei der Nettokonzentration der Th2-assoziierten Zytokine IL-10 und IL-4 bestanden nur minimale Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, wobei die Produktion von IL-4 bei beiden Behandlungsgruppen generell sehr gering war (Abb. 11).

Auch war die Sezernierung von TNF- α durch Zellen der Milz nur sehr gering. Der TNF- α -Gehalt in den Überständen von nicht stimulierten, aber auch mit dem IRBPp161-180 stimulierten Zellen lag zumeist unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA. Auch bei Stimulation der Zellen mit ConA, was zu einer starken Produktion der anderen Zytokine über den genauen Messbereich des ELISA führte, konnten nur geringe TNF- α -Konzentrationen bis maximal 32 pg/ml in den Zellkulturüberständen detektiert werden. Dementsprechend lagen keine Unterschiede oder nur von wenigen pg/ml zwischen den Behandlungsgruppen im TNF- α -Gehalt vor.

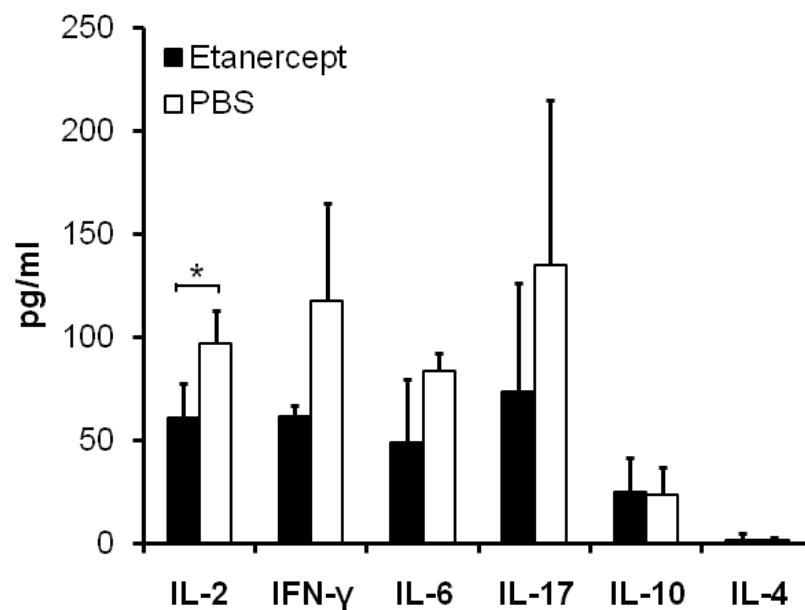


Abb. 11: Antigen-spezifischer Nettogehalt von Zytokinen in 24h Zellkulturüberständen der Milz. (IL-2) Etanercept: $61,5 \pm 16,5$ pg/ml; PBS: $96,6 \pm 16,3$ pg/ml; t-Test: $p=0,023$. (IFN- γ) Etanercept: $62,04 \pm 5,04$ pg/ml; PBS: $117,7 \pm 47,05$ pg/ml; t-Test: $p=0,057$. (IL-6) Etanercept: $49,4 \pm 30,4$ pg/ml; PBS: $84,5 \pm 8,6$ pg/ml; t-Test: $p=0,068$. (IL-17) Etanercept: $73,95 \pm 52,1$ pg/ml; PBS: $134,7 \pm 79,8$ pg/ml; t-Test: $p=0,249$; (IL-10) Etanercept: $25 \pm 16,8$ pg/ml; PBS: $23,8 \pm 13,1$; t-Test: $p=0,911$; (IL-4) Etanercept: $2,2 \pm 2,7$ pg/ml; PBS: $2,2 \pm 0,9$ pg/ml; t-Test: $p=1$.

3.4.4 *In vivo* Zytokingehalt vollständiger Augen

Um den *in vivo* Zytokingehalt in den okulären Geweben zu untersuchen, wurden die Augen unmittelbar nach der Entnahme durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Der Zytokingehalt wurde von dem Überstand des Homogenisats eines vollständigen Auges bestimmt. Dabei konnte der Trend eines allgemein leicht verringerten Zytokingehalts in den okulären Geweben von Mäusen nach der systemischen Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Zum Zeitpunkt der Entnahme der Augen (Tag 21 nach der aktiven Immunisierung) wurden sowohl in der Etanercept-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe nur geringe Mengen des Zielmoleküls TNF- α in den okulären Geweben detektiert (Abb. 12). Die Daten zum Zytokingehalt in den okulären Geweben bzw. in Zellkulturüberständen der Milz stammten aus voneinander unabhängigen Versuchsreihen mit gleichem Behandlungsschema. Der beobachtete Trend des reduzierten Zytokingehalts im okulären Gewebe bei der Etanerceptgruppe konnte in einem Wiederholungsexperiment mit geringerem Stichprobenumfang reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

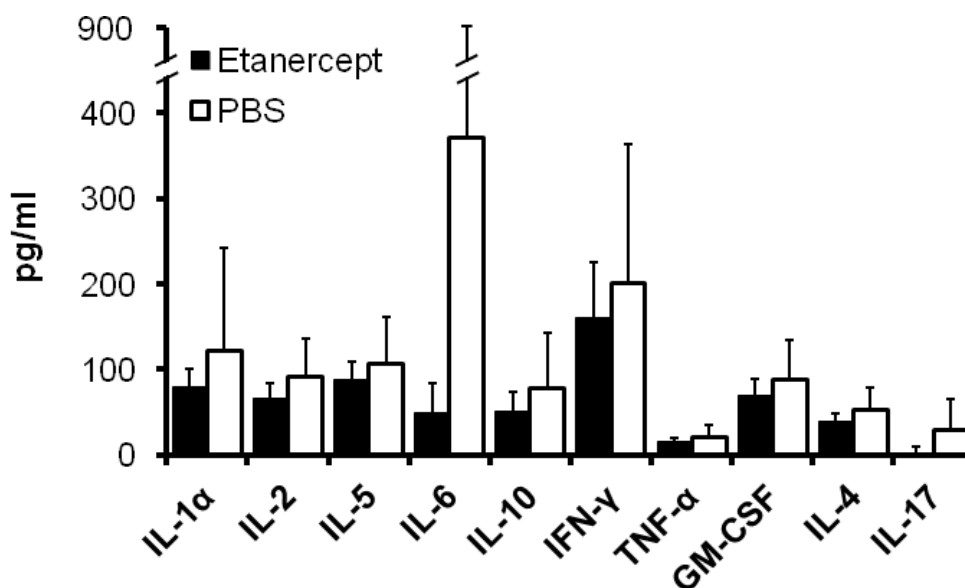


Abb. 12: *In vivo* Zytokingehalt in den okulären Geweben vollständiger Augen nach Bestimmung durch Multiplex Bead Assay. Die Daten eines repräsentativen Experiments sind dargestellt und entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung einzeln gemessener Augen (Etanercept: N=6; PBS: N=6).

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur systemischen Etanercept-Applikation in der afferenten Phase der EAU

Nach einer generell leichteren Modellinduktion war der Entzündungsgrad der Augen von Etanercept behandelten Mäusen signifikant reduziert. Zudem waren die antigenspezifische Proliferation und Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Milzzellen in der Etanercept-Gruppe vermindert. Auch bezüglich der Zytokinkonzentration in den okulären Geweben konnte ein Trend zu einer allgemeinen Verringerung in der Etanercept-Gruppe beobachtet werden.

3.5 Lokale Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch eine systemische TNF-Inhibition in der afferenten Phase mit Etanercept das EAU-Modell beeinflusst werden kann, wurde in einem nächsten Schritt der Effekt einer lokalen Etanercept Gabe untersucht. Zur lokalen Applikation am Ort der Entzündung wurde der Wirkstoff direkt in den Glaskörper (intravitreal) eines Auges oder unter die Bindehaut (subkonjunktival) eines Auges injiziert. Die subkonjunktivale Etanercept-Injektion erfolgte nach dem bei der systemischen Applikation bewährten Behandlungsschema an Tag -1, 1, 3 und 5 nach der Immunisierung. Um mechanische Verletzungen des Auges und experimentelle Artefakte durch die intravitreale Injektion gering zu halten, wurden über den Zeitraum der afferenten Phase von Tag -1 bis 5 nur drei intravitreale Injektionen an den Tagen -1, 2 und 5 nach der Immunisierung durchgeführt.

3.5.1 Intravitreale Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU

Nach der intravitrealen Applikation von Etanercept war der histopathologische EAU-Schweregrad des behandelten Auges im Vergleich zu den mit PBS behandelten Augen der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Auch im EAU-Schweregrad des nicht injizierten, unbehandelten Auges konnte eine Reduktion bei der Etanercept-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese Reduktion war zwar nicht signifikant, allerdings lag der p-Wert nahe der Grenze zum statistischen Signifikanzniveau (Abb. 13; siehe S. 93).

Nach der intravitrealen Applikation von Etanercept in der afferenten Phase bestand im Vergleich zur Kontrollgruppe kein statistischer Unterschied in der antigenspezifischen Proliferation der Milzzellen (Abb. 14; siehe S. 93).

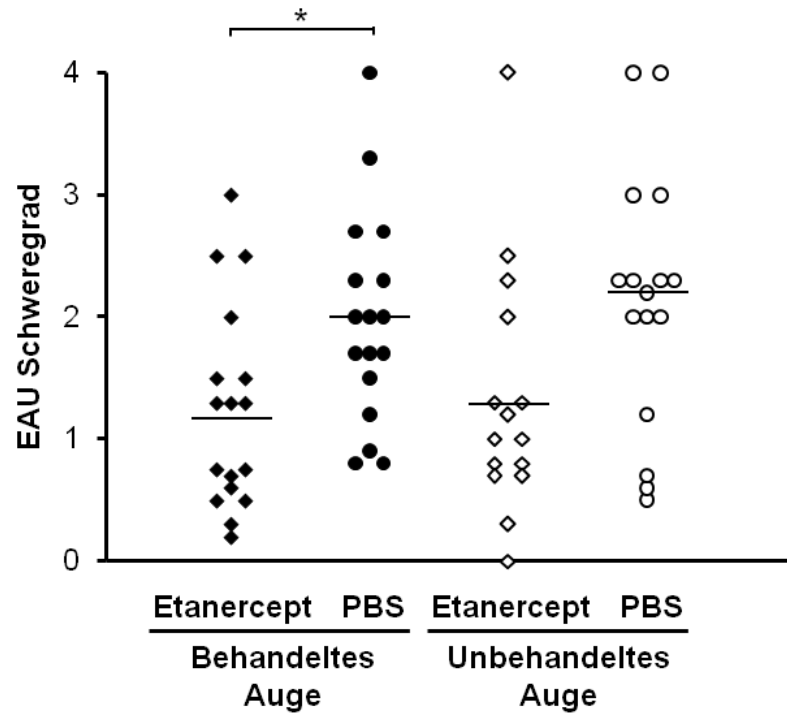


Abb. 13: Histologische Beurteilung des EAU-Schweregrades des behandelten und unbehandelten Auges nach intravitrealer Applikation von Etanercept in der afferenten Phase (Behandeltes Auge: Etanercept: N=17; EAU-Schweregrad=1,2 ± 0,8. PBS: N=17; EAU-Schweregrad=2,0 ± 0,9; Mann-Whitney-U-Test: p=0,012*. Unbehandeltes Auge: Etanercept: N=15; EAU-Schweregrad=1,3 ± 1,0; PBS: N=16; EAU-Schweregrad=2,2 ± 1,1; Mann-Whitney-U-Test: p=0,052). Die dargestellten Daten entsprechen den zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten.

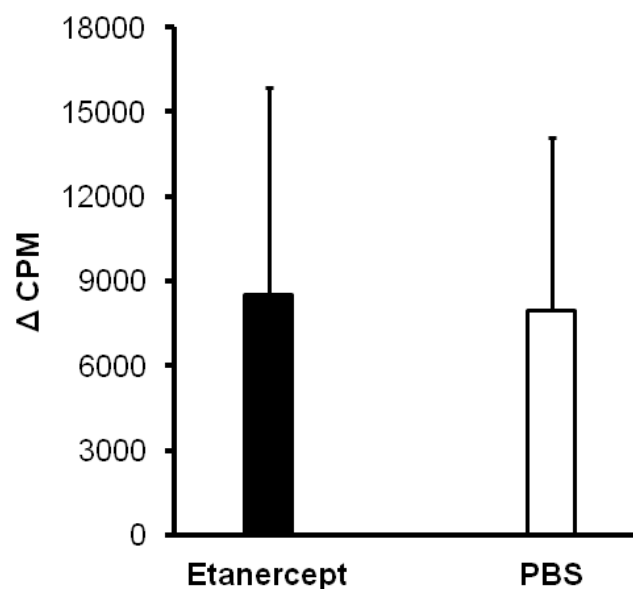


Abb. 14: IRBPp161-180-spezifische Proliferation von Milzzellen nach intravitrealer Etanercept-Behandlung in der afferenten Phase (Etanercept: Δ CPM=8503 ± 7340; PBS: Δ CPM=7947 ± 6161; t-Test: p=0,818). Die Milzzellen von Tieren einer Behandlungs-Gruppe wurden vereint. Die dargestellten Daten entsprechen den zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten.

Das Muster der antigenspezifischen Zytokinproduktion durch Milzzellen nach der intravitrealen Etanercept-Applikation bestand in einer signifikanten Reduktion des zentralen Th1-Zytokins IFN- γ , wohingegen die Th2-assoziierten Zytokine IL-6 (signifikant) und tendenziell auch IL-10 erhöht waren. Die antigenspezifische Konzentration von IL-10 war in der Etanercept-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verdoppelt. Die Konzentration des zentralen Th2-Zytokins IL-4 war in der Etanercept-Gruppe hingegen signifikant reduziert. Allerdings wurde IL-4 auch in der Kontrollgruppe nur in geringem Maße sezerniert, sodass der Unterschied in der IL-4-Konzentration zwischen den Behandlungsgruppen nur wenige pg/ml betrug. Auch in der Konzentration von IL-2 und IL-17 bestanden nur geringfügige Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 15).

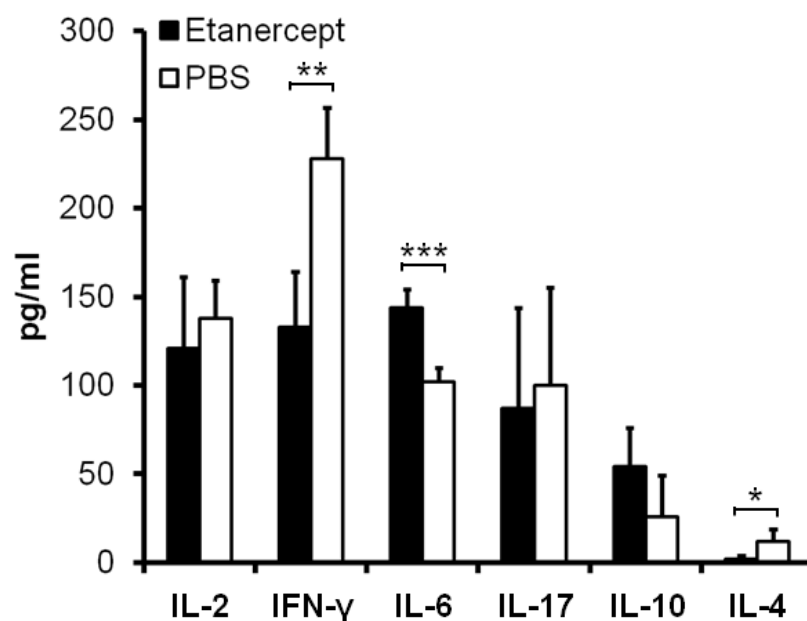


Abb. 15: Antigenspezifischer Nettogehalt von Zytokinen in 24h Zellkulturüberständen der Milz nach intravitrealer Etanercept-Behandlung in der afferenten Phase. Die dargestellten Daten entsprechen den zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten. (IL-2) Etanercept: $121,4 \pm 40,3$ pg/ml; PBS: $138,1 \pm 20,8$ pg/ml; t-Test: $p=0,489$. (IFN- γ) Etanercept: $132,7 \pm 31,4$ pg/ml; PBS: $227,7 \pm 28,6$ pg/ml; t-Test: $p=0,009$. (IL-6) Etanercept: $144 \pm 9,9$ pg/ml; PBS: $101,6 \pm 7,9$ pg/ml; t-Test: $p<0,001$. (IL-17) Etanercept: $87,4 \pm 57,3$ pg/ml; PBS: $99,5 \pm 54,7$ pg/ml; t-Test: $p=0,770$. (IL-10) Etanercept: $53,8 \pm 22,1$ pg/ml; PBS: $26,3 \pm 22,9$; t-Test: $p=0,135$; (IL-4) Etanercept: $1,7 \pm 2,1$ pg/ml; PBS: $11,9 \pm 7,1$ pg/ml; t-Test: $p=0,032$.

Dieses in Zellkulturüberständen der Milzzellen beobachtete Zytokinmuster wurde durch die Bestimmung des Zytokingehaltes in den okulären Geweben nicht bestätigt. Bei einem Vergleich des Zytokingehalts der injizierten Augen mit dem von nicht injizierten Augen innerhalb einer Behandlungsgruppe zeigte sich, dass die Menge der verschiedenen Zytokine in den injizierten Augen stets leicht höher war als in den unbehandelten, nicht injizierten Augen. Dies galt sowohl für die Kontrollgruppe (Abb. 16) als auch für die Etanercept-Gruppe (Abb. 17; siehe S. 96), wobei IL-6 bei der Kontrollgruppe und TNF- α bei der Etanercept-Gruppe eine Ausnahme bildeten. In der Kontrollgruppe wurde für IL-6 im unbehandelten Auge ein höherer Wert gemessen als im injizierten Auge und in der Etanercept-Gruppe wurde die gleiche Menge von TNF- α im injizierten und unbehandelten Auge gemessen. Bei einem Vergleich des Zytokingehalts der behandelten Augen ergaben sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 18; siehe S. 96).

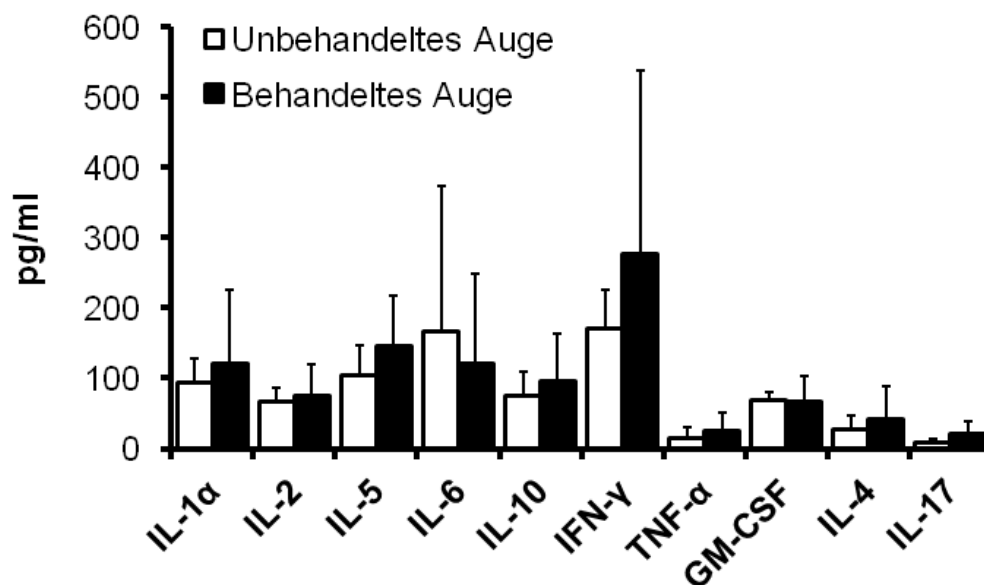


Abb. 16: In vivo Zytokingehalt unbehandelter und behandelter (intravitreale PBS-Injektion) Augen der Kontrollgruppe (je N=6). Die Daten eines repräsentativen Experiments sind dargestellt (Unbehandeltes Auge: IL-1 α =93,9 \pm 34,4 pg/ml; IL-2=66,6 \pm 19,4; IL-5=104,8 \pm 42; IL-6=167,5 \pm 206,3; IL-10=75,8 \pm 33,8; IFN- γ =171,2 \pm 54,8; TNF- α =15,6 \pm 15,2; GM-CSF=68,2 \pm 12,6; IL-4=27,6 \pm 19,7; IL-17=7,7 \pm 6,7; Behandeltes Auge: 121,5 \pm 104,6; IL-2=74,6 \pm 45,5; IL-5=144,8 \pm 72,3; IL-6=120,5 \pm 127,9; IL-10=95,5 \pm 67,8; IFN- γ =277,4 \pm 261; TNF- α =25,8 \pm 25,0; GM-CSF=67,4 \pm 34,6; IL-4=41 \pm 46,9; IL-17=19,9 \pm 18,9).

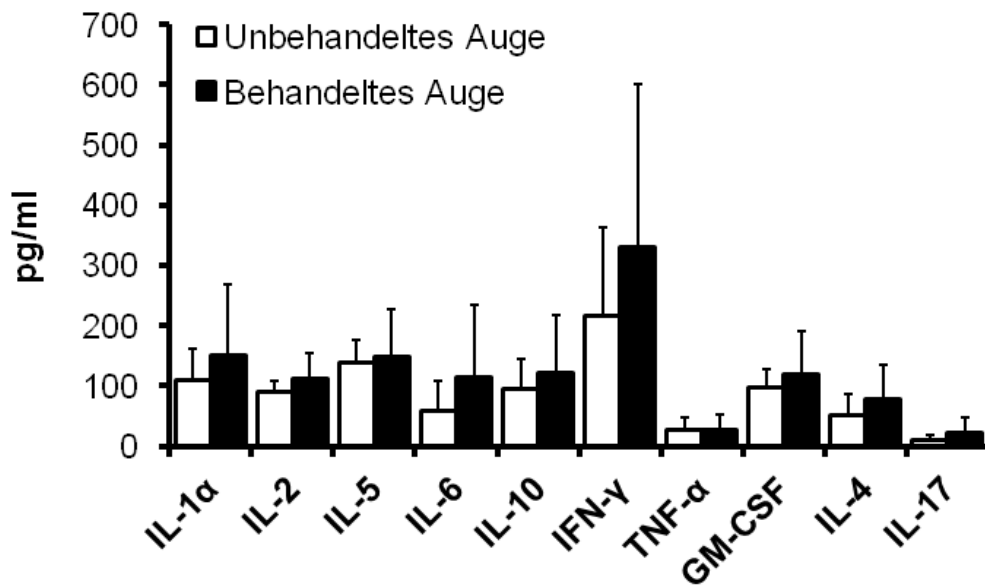


Abb. 17: In vivo Zytokingehalt von unbehandelten und durch intravitreale Injektion behandelten Augen (je N=6) der Etanercept-Gruppe. Die Daten eines repräsentativen Experiments sind dargestellt (Unbehandeltes Auge: IL-1α=109,5 ± 51,2 pg/ml; IL-2=89,6 ± 18,1; IL-5=137,6 ± 39,3; IL-6=57,4 ± 50,5; IL-10=95,2 ± 49; IFN-γ=217 ± 145,4; TNF-α=27,2 ± 19,6; GM-CSF=98,2 ± 28,7; IL-4=52 ± 33,7; IL-17=10,8 ± 7,8; Behandeltes Auge: IL-1α=150,5 ± 118,9; IL-2=111 ± 44; IL-5=149,2 ± 77,5; IL-6=113,6 ± 121,1; IL-10=121,9 ± 94,4; IFN-γ=329,5 ± 271,4; TNF-α=27,3 ± 24,5; GM-CSF=118 ± 72,5; IL-4=78 ± 56,7; IL-17=21,4 ± 26,7).

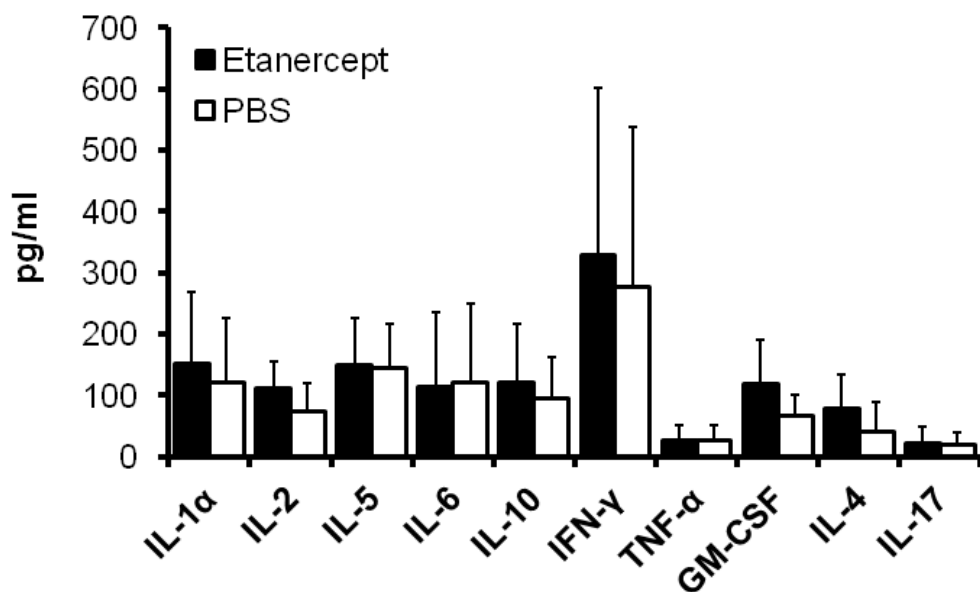


Abb. 18: In vivo Zytokingehalt der okulären Gewebe nach intravitrealer Injektion in der afferenten Phase. Mittelwerte ± Standardabweichungen der behandelten Augen von der Etanercept-Gruppe und der Kontrollgruppe eines repräsentativen Experiments sind dargestellt (für Rohdaten siehe Legende von Abb. 16 und Abb. 17).

3.5.2 Subkonjunktivale Applikation von Etanercept in der afferenten Phase der EAU

Nach der subkonjunktivalen Applikation von Etanercept in der afferenten Phase wurde kein statistischer Unterschied im EAU-Schweregrad des behandelten Auges im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Etanercept-Gruppe: $N=7$; EAU-Schweregrad= $1,3 \pm 0,9$ [Mittelwert \pm Standardabweichung]; PBS-Gruppe: $N=4$; EAU-Schweregrad= $1,5 \pm 0,8$; Mann-Whitney-U-Test: $p=1$). Allerdings bestand ein Trend zu einem reduzierten EAU-Schweregrad im nicht behandelten Auge bei der Etanercept-Gruppe (Etanercept-Gruppe: EAU-Schweregrad= $1,01 \pm 0,5$; PBS-Gruppe: EAU-Schweregrad= $2,03 \pm 0,7$; Mann-Whitney-U-Test: $p=0,052$), der aber eher auf den geringen Stichprobenumfang für das unbehandelte Auge in der PBS-Kontrolle sowie die generelle Varianz in diesem Modell zurückgeführt werden kann als auf Wirkstoff-spezifische Effekte. Unterschiede in Stichprobenprobenumfängen sind durch das Sterben einzelner Tiere während eines laufenden Experiments oder den Verlust einzelner Augen bei dem Prozess der Entnahme und weiteren Aufarbeitung zu erklären. Die antigenspezifische Netto-Proliferation von Milzzellen war in der Etanercept-Gruppe im Vergleich zur PBS-Kontrolle erhöht (Etanercept-Gruppe: $\Delta\text{CPM}=12664,3 \pm 4244,2$; PBS-Gruppe: $\Delta\text{CPM}=7001,7 \pm 4540,8$; t-Test: $p=0,022$).

3.6 Systemische und lokale Behandlung mit Etanercept in der efferenten Phase der EAU

Aus der medizinischen Perspektive ist eine therapeutische Behandlungsmöglichkeit in der klinischen Phase der Erkrankung von besonderem Interesse. Daher wurde in weiteren Experimenten der Effekt der systemischen und lokalen Etanercept-Applikation in der efferenten Phase des EAU-Modells untersucht. Der Wirkstoff wurde dazu an den Tagen 6, 9 und 12 nach der aktiven Immunisierung injiziert.

Die Ergebnisse zeigten weder nach der systemischen Applikation noch nach den lokalen Applikationen in Form intravitrealer oder subkonjunktivaler Injektionen von Etanercept signifikante Unterschiede im EAU-Schweregrad im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen. Außerdem konnten keine konsistenten Unterschiede hinsichtlich der antigenspezifischen Netto-Proliferation von Milzzellen zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden. Während die antigenspezifische Proliferation nach der intravitrealen Etanercept-Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war, war die antigenspezifische Proliferation nach der systemischen Etanercept-Gabe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Bei der subkonjunktivalen Etanercept-Applikation lagen nur geringfügige Unterschiede in der antigenspezifischen Proliferation zwischen den Behandlungsgruppen vor. Die Daten zur Etanercept-Behandlung in der efferenten Phase sind

in Tabelle 2 dargestellt. Für die systemische Behandlung ist der EAU-Schweregrad des rechten Auges und für die lokale Applikation (intravitreal und subkonjunktival) der EAU-Schweregrad des behandelten Auges angegeben.

Tabelle 2: Etanercept-Behandlung in der efferenten Phase

Behandlung	Gruppe	EAU-Grad	p-Wert	Δ CPM	p-Wert
Systemisch	Etanercept	$1,8 \pm 1,4$ (N=14)	0,469	6015 ± 5460	0,015
	PBS	$2,1 \pm 1,5$ (N=15)		2138 ± 1904	
Intravitreal	Etanercept	$1,8 \pm 1,1$ (N=11)	0,081	2066 ± 798	<0,001
	PBS	$1,1 \pm 0,6$ (N=11)		5421 ± 1746	
Subkonjunktival	Etanercept	$1,8 \pm 0,6$ (N=10)	0,783	230 ± 449	0,849
	PBS	$2,1 \pm 0,7$ (N=8)		196 ± 200	

3.7 Systemische Behandlung mit Etanercept bei EAU-Induktion durch adoptiven Transfer

Um einen therapeutischen Effekt von Etanercept bei EAU weitergehend zu untersuchen, wurde der Einfluss der systemischen Etanercept-Gabe auf die EAU-Induktion durch adoptiven Transfer analysiert. Das adoptive Transfer-Modell spiegelt die klinische, efferente Phase beim Uveitis-Patienten wider, wenn bereits uveitogene Effektorzellen generiert und in der Zirkulation sind (Caspi 2006). Beim adoptiven Transfer wurde die EAU durch Übertragung von uveitogenen, antigenspezifischen und *in vitro* restimulierten Splenozyten induziert, die aus aktiv immunisierten Spendertieren gewonnen wurden. Die Empfängertiere dieser Zellen wurden an den Tagen -1, 1, 3 und 5 nach dem adoptiven Transfer systemisch mit Etanercept oder zur Kontrolle mit PBS behandelt.

Bei den Empfängertieren beider Behandlungsgruppen löste der adoptive Transfer eine EAU aus, die durch die gleichen, typischen, in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen histopathologischen Eigenschaften einer durch aktive Immunisierung induzierten EAU charakterisiert war. Dabei bestanden keine statistischen Unterschiede im EAU-Schweregrad der beiden Behandlungsgruppen (Abb. 19; siehe S. 99).

Auch die antigenspezifische Netto-Proliferation der Milzzellen war nicht signifikant verschieden zwischen Etanercept-behandelten Tieren und Kontrolltieren (Abb. 20; siehe S. 99).

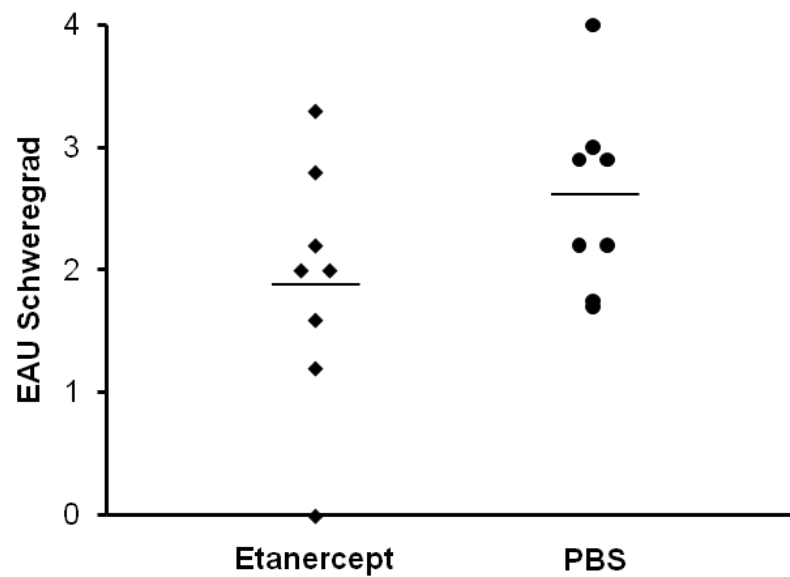


Abb. 19: EAU-Schweregrad nach Modellinduktion durch adoptiven Transfer und nach systemischer Etanercept-Behandlung (Etanercept-Gruppe: N=8; EAU-Schweregrad=1,9 ± 1,0; PBS-Gruppe: N=8; EAU-Schweregrad=2,6 ± 0,8; Mann-Whitney-U-Test: p=0,14).

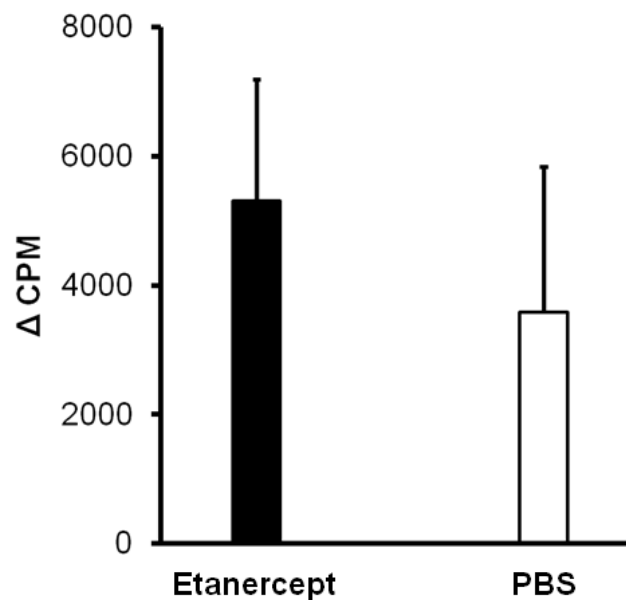


Abb. 20: IRBPp161-180-spezifische Netto-Proliferation von Milzzellen nach systemischer Behandlung mit Etanercept bei EAU-Induktion durch adoptiven Transfer. Die Proliferation der Milzzellen wurde für jedes Tier in Einzelbestimmung untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Tiere einer Behandlungsgruppe (Etanercept-Gruppe: N=8; ΔCPM=5305,4 ± 1889,7; PBS-Gruppe: N=8; ΔCPM=3588,4 ± 2253,3; t-Test: p=0,121).

3.8 Einfluss von Etanercept auf die Induktion von VCAID

ACAID und VCAID entsprechen einer bestimmten Immunantwort, die durch die Einführung von Antigenen in die Vorderkammer bzw. in den Glaskörper ausgelöst wird. Dabei werden in der Milz regulatorische T-Zellen induziert, die eine Th1-vermittelte Entzündungsreaktion hemmen (Streilein 2003; Sonoda et al. 2005). Es wird angenommen, dass TNF- α eine wichtige Rolle bei der Auslösung von ACAID bzw. VCAID spielt (Ferguson et al. 1994). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die intravitreale Injektion von Etanercept einen Einfluss auf die VCAID-Induktion hat. Zur VCAID-Induktion wurde OVA als Antigen in den Glaskörper injiziert. Das OVA wurde dazu in PBS (Positivkontrolle) oder in der Etanercept-Stocklösung gelöst. Als Negativkontrolle erhielt eine Gruppe von Mäusen ausschließlich eine intravitreale Injektion von PBS. Als Maß für die VCAID-Induktion gilt die Ausprägung bzw. Unterdrückung einer DTH-Reaktion. Die DTH-Reaktion bei Mäusen, die eine intravitreale Injektion von OVA bekamen, war im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert. Mäuse, welchen OVA zusammen mit Etanercept intravitreal injiziert wurde, zeigten wiederum eine stärkere DTH-Reaktion als die Positivkontrolle (Abb. 21; siehe S. 101).

Um die Daten der DTH-Reaktion weiter zu analysieren, wurde zusätzlich die OVA-spezifische Produktion von IL-10 durch Zellen der Milz untersucht. Das OVA-spezifische Expressionsmuster des kennzeichnenden Zytokins regulatorischer T-Zellen IL-10 stand der DTH-Reaktion diametral gegenüber. Nach der Injektion von OVA in den Glaskörper war die IL-10-Konzentration in Zellkulturüberständen der Milz höher als nach der ausschließlichen intravitrealen Injektion von PBS. Wurde OVA zusammen mit Etanercept in den Glaskörper injiziert, war der IL-10-Gehalt gegenüber der Positivkontrolle leicht reduziert. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in der IL-10-Konzentration erreichten nicht das statistische Signifikanzniveau (Abb. 22; siehe S. 101).

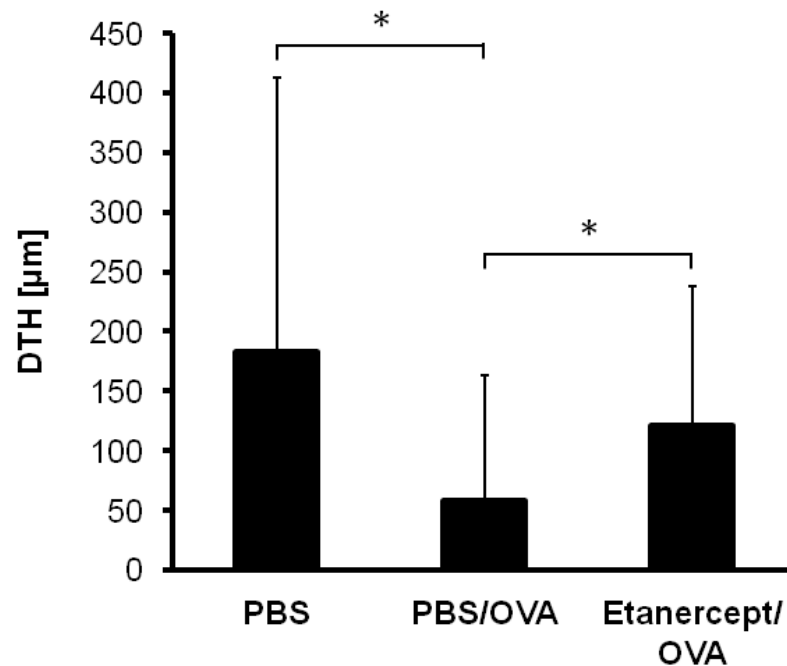


Abb. 21: OVA-spezifische DTH-Reaktion nach intravitrealer Injektion von PBS (Negativkontrolle), OVA (gelöst in PBS) zur VCAID-Induktion (Positivkontrolle) oder OVA + Etanercept. Dargestellt sind zusammengefasste Daten von zwei repräsentativen Experimenten (PBS: N=17; DTH=183,2 ± 229,9 µm; PBS/OVA: N=15; DTH=58 ± 104,9 µm; Etanercept/OVA: N=20; DTH=121,4 ± 116,2 µm; Kruskal-Wallis Test: p=0,036).

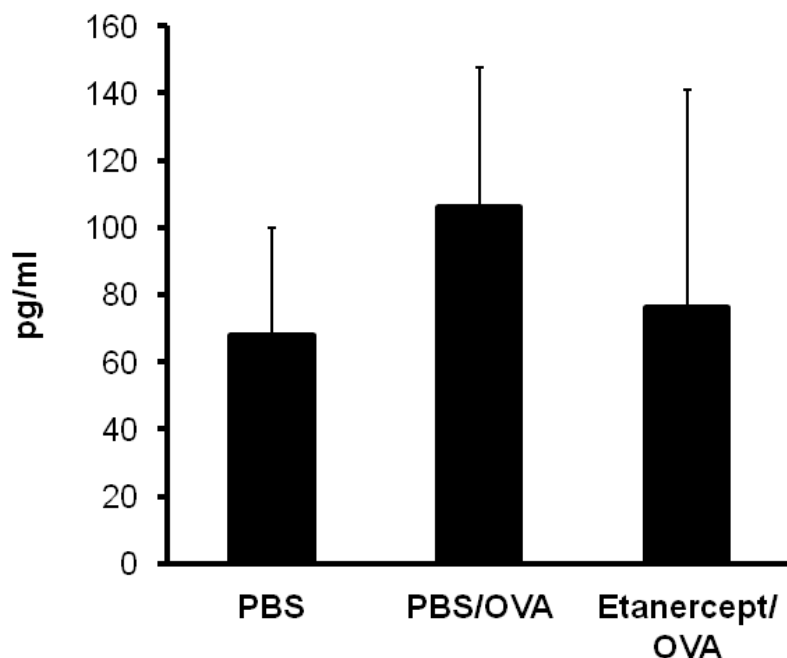


Abb. 22: IL-10-Konzentration in Zellkulturüberständen von Milzzellen nach intravitrealer Injektion von PBS (Negativkontrolle), OVA (gelöst in PBS) zur VCAID-Induktion (Positivkontrolle) oder OVA + Etanercept (PBS: N=7; IL-10=67,9 ± 32,01 pg/ml; PBS/OVA: N=12; IL-10=106,2 ± 41,3 pg/ml; Etanercept/OVA: N=12; IL-10=76,4 ± 64,6 pg/ml; ANOVA: p=0,211).

3.9 Lokale Applikation von ASON

Die EAU bei B10.RIII-Mäusen ist durch einen schweren und besonders akuten Verlauf gekennzeichnet, was ein therapeutisches Eingreifen in diesem Modell erschweren kann (Hankey et al. 2001). Da Etanercept über einen kompetitiven Mechanismus wirkt, indem es mit den natürlich vorkommenden TNF-Rezeptoren um die Bindung an TNF- α konkurriert, wurden in einem weiteren Schritt ASON gegen TNF- α als Wirkstoffkontrolle zu Etanercept eingesetzt und deren Einfluss auf den EAU-Schweregrad nach lokaler Applikation untersucht. Diese ASON wirken bereits auf der Ebene der Translation, indem sie an die mRNA von TNF- α binden. Dadurch wird die Expression des Zielmoleküls TNF- α blockiert.

3.9.1 *In vitro* TNF- α Inhibition durch ASON

Die Wirksamkeit der gegen die TNF- α mRNA gerichteten ASON in der Hemmung der *in vitro* TNF- α -Expression von Knochenmarkmakrophagen wurde mit Hilfe eines Western Blot untersucht. Die TNF- α -spezifische Bande bei 26 kDa des Zelllysates von Knochenmarkmakrophagen, die mit LPS und IFN- γ stimuliert wurden, war stärker ausgeprägt als die der Zelllysate von Knochenmarkmakrophagen, die neben LPS und IFN- γ zusätzlich mit ASON oder KON inkubiert wurden (Abb. 23 A; siehe S. 103). Die Stärke der β -Aktin-Bande bei 45 kDa war für die unterschiedlich behandelten Knochenmarksmakrophagen hingegen gleich (Abb. 23 B; siehe S. 103), sodass die Normalisierung der TNF- α -Banden anhand der β -Aktin-Banden durch Analyse der Graustufen eine leicht verringerte TNF- α -Expression von stimulierten Knochenmarkmakrophagen bei Inkubation mit ASON oder KON aufzeigte (Graustufen-Wert der TNF- α -Bande bei der ASON-Gruppe [in Prozent zur entsprechenden β -Aktin-Bande]: 79,6 %; Graustufen-Wert der TNF- α -Bande bei der KON-Gruppe [in Prozent zur entsprechenden β -Aktin-Bande]: 79,7 %; Graustufen-Wert der TNF- α -Bande bei der LPS/IFN- γ -Gruppe [in Prozent zur entsprechenden β -Aktin-Bande]: 84,6 %).

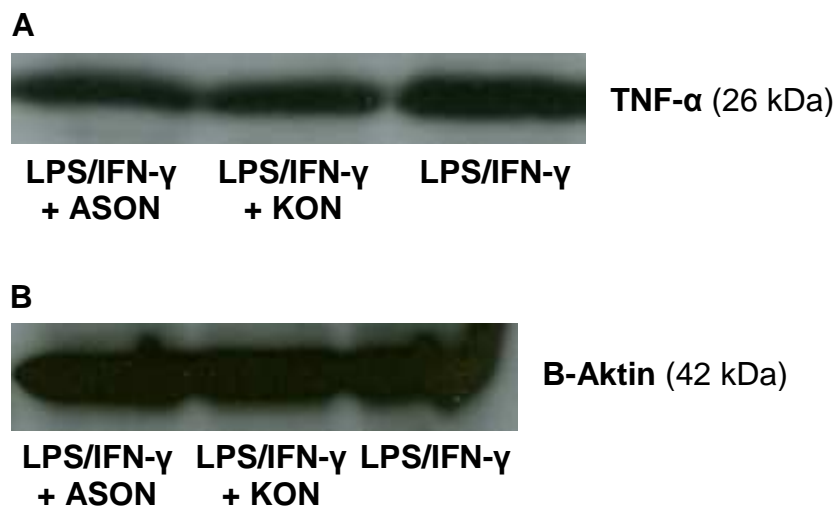


Abb. 23: Untersuchung der Zelllysate von stimulierten Knochenmarkmakrophagen im Western Blot. (A) Banden bei 26 kDa auf einer mit anti-TNF- α -Antikörpern inkubierten PVDF-Membran. (B) Banden bei 42 kDa auf einer mit anti- β -Aktin-Antikörpern inkubierten PVDF-Membran.

Zusätzlich zur Untersuchung der Zelllysate der Knochenmarkmakrophagen im Western Blot wurden die Zellkulturüberstände der Knochenmarkmakrophagen in einem Bioassay an L929-Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden L929-Zellen mit seriellen Verdünnungsstufen eines rekombinanten TNF- α -Standards inkubiert. Bei einer TNF- α -Konzentration von 55 U/ml wurde ein etwa gleiches Verhältnis von lebenden zu toten L929-Zellen beobachtet (Abb. 24 B; siehe S. 104). Wurden die L929-Zellen ausschließlich mit RPMI inkubiert, waren mindestens 95 % der Zellen vital (Abb. 24 A; siehe S. 104). Bei L929-Zellen hingegen, die mit Zellkulturüberständen von LPS- und IFN- γ -stimulierten Knochenmarkmakrophagen inkubiert wurden, lag der Anteil toter Zellen bei etwa 95 % (Abb. 24 E; siehe S. 104). Dieser Anteil toter L929-Zellen war bei der Inkubation mit Zellkulturüberständen von Knochenmarkmakrophagen, die neben LPS und IFN- γ mit ASON oder KON inkubiert wurden, auf etwa 75 % (Abb. 24 C; siehe S. 104) bzw. 60 % (Abb. 24 D; siehe S. 104) reduziert. Dies lässt auf einen verringerten Gehalt an bioaktivem TNF- α in den Zellkulturüberständen von Knochenmarkmakrophagen schließen, die neben LPS und IFN- γ mit ASON oder KON inkubiert wurden.

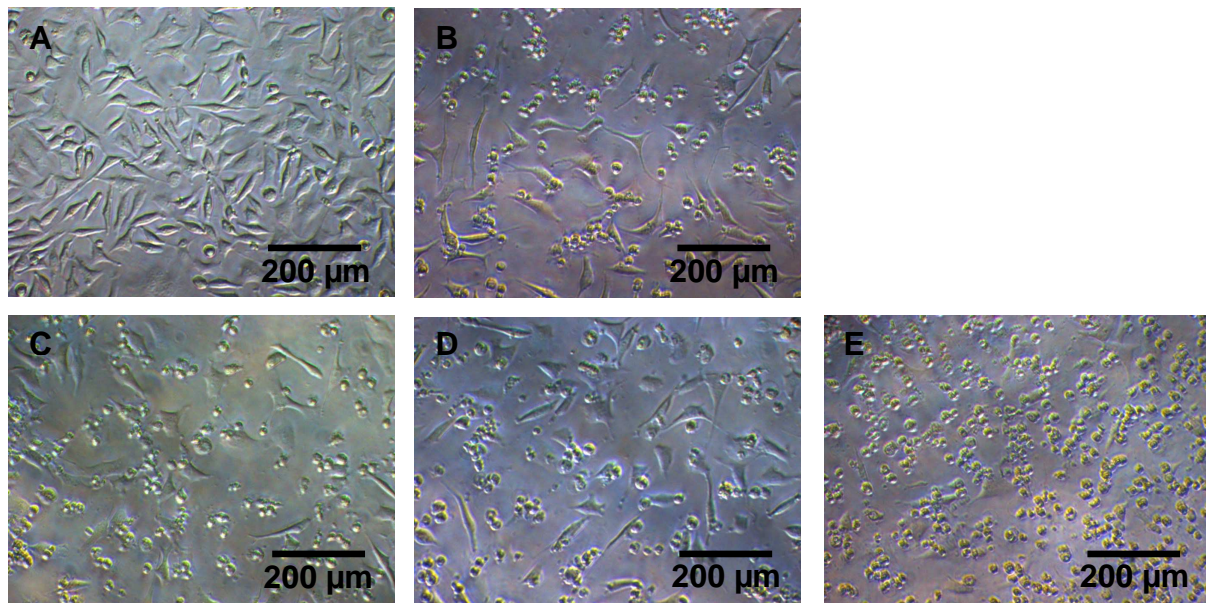


Abb. 24: Untersuchung der Zellkulturüberstände von Knochenmarksmakrophagen im Bioassay an L929-Zellen. Inkubation der L929-Zellen mit (A) RPMI; (B) TNF- α -Standard (55 U/ml); (C) Zellkulturüberständen von Knochenmarksmakrophagen nach Inkubation mit LPS/IFN- γ und ASON; (D) Zellkulturüberständen von Knochenmarksmakrophagen nach Inkubation mit LPS/IFN- γ und KON; (E) Zellkulturüberständen von Knochenmarksmakrophagen nach Inkubation mit LPS/IFN- γ .

3.9.2 Aufnahme FITC-markierter Kontrolloligonukleotide nach lokaler Applikation

Um die Aufnahme, Verteilung und Kinetik der ASON nach lokaler Applikation nachvollziehen zu können, wurden nicht immunisierten Tieren einmalig FITC-markierte Kontrolloligonukleotide intravitreal oder subkonjunktival injiziert. Die Dosierung der FITC-markierten Kontrolloligonukleotide entsprach der bei der ASON-Behandlung eingesetzten Dosis. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion entnommene Augen wurden fluoreszenzmikroskopisch und Einzelzellsuspensionen aus der Milz oder den regionalen, abführenden Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Gewebeschnitten der Augen ergab bei intravitrealer Injektion nach allen drei Zeitpunkten ein positives FITC-Signal in den nicht pigmentierten Epithelzellen des Ziliarkörpers (Abb. 25 D; siehe S. 105), in der Iris (Abb. 25 C; siehe S. 105) und in der Retina. Die fokalen, punktförmigen Bereiche der Fluoreszenz erstreckten sich dabei nahezu über die gesamte Retinabreite von der Ganglienzellschicht bis zur äußeren Körnerschicht (Abb. 25 A; siehe S. 105). Innerhalb der äußeren Körnerschicht war die Zahl der fluoreszierenden Signale deutlich niedriger.

Eine Immunfluoreszenzfärbung von GFAP auf diesen Gewebeschnitten zeigte eine Kolokalisation der FITC-markierten Kontrolloligonukleotide und GFAP-positiven Zellen der Retina (Abb. 25 B), was eine Aufnahme der intravitreal injizierten Oligonukleotide durch Gliazellen der Retina nahelegt. Auch in Bindegewebeanteilen um das Auge und in der Sklera konnte ein positives Fluoreszenzsignal registriert werden, was vermutlich auf den geringen Rückfluss FITC-markierter Kontrolloligonukleotide durch den Injektionskanal in die Bindehaut zurückzuführen ist. In Kornea, Vorderkammer, Glaskörper und Aderhaut wurde kein positives FITC-Signal beobachtet.

Nach subkonjunktivaler Applikation FITC-markierter Kontrolloligonukleotide konnte zu keinem Zeitpunkt ein intraokuläres positives FITC-Signal detektiert werden (Abb. 25 E). Das FITC-Signal beschränkte sich auf den Bereich des Bindegewebes um das Auge und die stark positive Sklera.

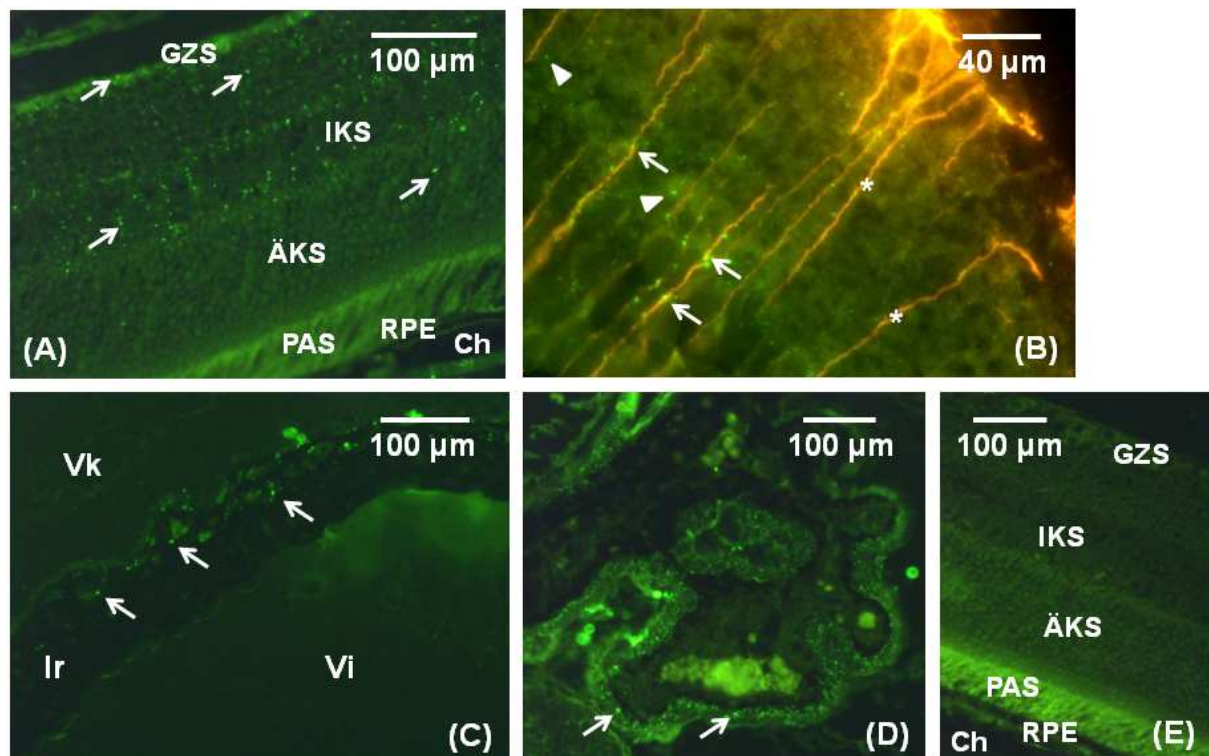


Abb. 25: (A) Verteilung von FITC-markierten Kontrolloligonukleotiden in der Retina nach intravitrealer Injektion. GZS: Ganglienzellschicht; IKS: Innere Körnerschicht; ÄKS: Äußere Körnerschicht; PAS: Photorezeptoraußensegmente; RPE: Retinales Pigmentepithelium; Ch: Choroidea. (B) Lokalisation (Pfeile) von FITC-markierten Kontrolloligonukleotiden (Dreiecke) bei GFAP-positiven Zellen (*) nach intravitrealer Injektion. (C) Verteilung von FITC-markierten Kontrolloligonukleotiden (Pfeile) in Irisgewebe (Vk: Vorderkammer; Ir: Iris; Vi: Vitreus) und (D) Ziliarkörper nach intravitrealer Injektion. (E) Keine FITC-markierten Kontrolloligonukleotide im Retinagewebe nach subkonjunktivaler Injektion.

Die durchflusszytometrischen Analysen der Einzelzellsuspensionen aus der Milz und den regionalen Lymphknoten zeigten, dass die subkonjunktival injizierten Oligonukleotide relativ rasch über die drainierenden Lymphknoten abtransportiert werden. 24 Stunden nach der subkonjunktivalen Injektion der FITC-markierten Kontrolloligonukleotide wurde ein Anteil von 20,5% FITC-positiver Zellen aus den regionalen abführenden, ipsilateral zum behandelten Auge gelegenen Lymphknoten gemessen. Mit zunehmender Dauer vom Zeitpunkt der Injektion nahm der Anteil FITC-positiver Zellen ab. Auch in den kontralateralen Lymphknoten und in der Milz war der Anteil FITC-positiver Zellen im Vergleich zu den ipsilateralen Lymphknoten reduziert.

Nach der intravitrealen Injektion FITC-markierter Kontrolloligonukleotide konnten zum 24-Stunden-Zeitpunkt geringe Anteile FITC-positiver Milzzellen und FITC-positiver Zellen der ipsilateralen regionalen Lymphknoten gemessen werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Prozentualer Anteil FITC-positiver Zellen in Einzelzellsuspensionen der Milz und der regionalen Lymphknoten nach intravitrealer oder subkonjunktivaler Injektion FITC-markierter Kontrolloligonukleotide.

Injektion	Zeitpunkt [Tage]	Lymphknoten		Milz
		Ipsilateral	Contralateral	
Intravitreal	1	5,1	0,3	2,3
	3	2,7	4,1	0,7
	5	5	1,6	0
Subkonjunktival	1	20,5	3	1,8
	3	14,7	6,1	0,6
	5	4,1*	3,4*	0*

N=4; *N=3

3.9.3 Effekt der lokalen Applikation von ASON auf die EAU

Bei der intravitrealen ASON-Behandlung in der afferenten Phase wurden die gleichen Zeitpunkte für die Injektionen gewählt wie bei der intravitrealen Etanercept-Behandlung. Kontrolltieren wurden entsprechende Volumina an TE-Puffer injiziert. Während nach der intravitrealen Injektion von Etanercept in der afferenten Phase eine Reduktion des EAU-Schweregrades im behandelten Auge vorlag, bestanden nach der intravitrealen Behandlung mit ASON in dieser Phase nur minimale Unterschiede im EAU-Schweregrad zwischen den Behandlungsgruppen. Dies galt sowohl für das injizierte als auch für das unbehandelte Auge

(Abb. 26). Auch die antigenspezifische Netto-Proliferation der Milzzellen zeigte nach der intravitrealen ASON-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied (ASON-Gruppe: $\Delta\text{CPM}=16586,2 \pm 6435,7$; TE-Gruppe: $\Delta\text{CPM}=14881,5 \pm 4109,6$; t-Test: $p=0,538$).

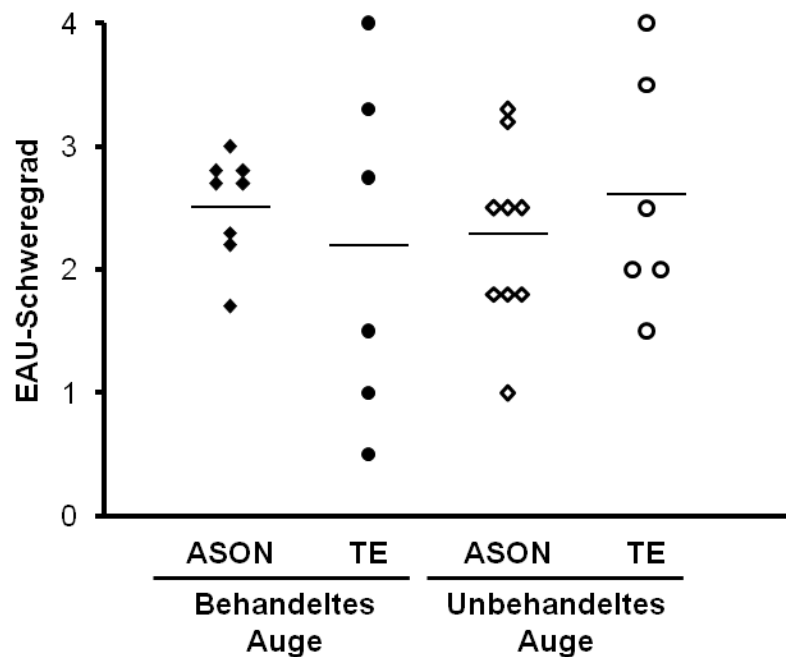


Abb. 26: Histologische Beurteilung des EAU-Schweregrades des behandelten und unbehandelten Auges nach intravitrealer ASON-Applikation in der afferenten Phase. Die horizontalen Balken geben die Mittelwerte an (Behandeltes Auge: ASON-Gruppe: $N=8$; EAU-Schweregrad= $2,5 \pm 0,4$. TE-Gruppe: $N=6$; EAU-Schweregrad= $2,2 \pm 1,4$. Unbehandeltes Auge: ASON-Gruppe: $N=9$; EAU-Schweregrad= $2,3 \pm 0,7$; TE-Gruppe: $N=6$; EAU-Schweregrad= $2,6 \pm 0,97$).

Weitere Versuchsreihen zeigten auch für die intravitreale und die subkonjunktivale Applikation in der efferenten Phase keinen reduzierenden Einfluss auf den EAU-Schweregrad des ASON-behandelten Auges. Die in Tabelle 4 (siehe S. 108) angegebenen Daten stellen eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten mit gleichem Behandlungsschema zur subkonjunktivalen ASON-Applikation dar. In diesen Experimenten wurden zusätzlich zur TE-Gruppe noch zwei weitere Kontrollgruppen mitgeführt. Eine dieser Gruppen wurde mit Kontrolloligonukleotiden (KON) behandelt, die in ihrer Sequenz den Kontrolloligonukleotiden aus der Aufnahmestudie glichen, aber nicht FITC-markiert waren. Die dritte Kontrollgruppe von Mäusen wurde zwar aktiv immunisiert, blieb aber anschließend unbehandelt (UB). Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wiesen die gleiche Tendenz

auf. In einem Experiment wurde bei allen Behandlungsgruppen nur eine sehr leichte EAU mit einer milden Verlaufsform ausgelöst. Daher ist der in Tabelle 4 angegebene durchschnittliche EAU-Schweregrad jeweils nur relativ gering. Demnach bewirkte die subkonjunktivale Applikation von ASON in der efferenten Phase auch bei einer schwach ausgeprägten EAU keine Besserung (Tabelle 4).

Tabelle 4: Subkonjunktivale ASON-Behandlung in der efferenten Phase

Auge	Gruppe	EAU-Schweregrad	p-Wert*
Behandelt	ASON	$0,5 \pm 0,9$ (N=23)	0,309
	KON	$0,7 \pm 0,9$ (N=20)	
	TE	$0,3 \pm 0,5$ (N=14)	
	UB	$0,6 \pm 0,8$ (N=11)	
Unbehandelt	ASON	$0,4 \pm 0,7$ (N=23)	0,962
	KON	$0,6 \pm 0,96$ (N=19)	
	TE	$0,2 \pm 0,3$ (N=14)	
	UB	$0,6 \pm 0,8$ (N=12)	

*Kruskal-Wallis-Test

3.10 Die Detektion des Zielmoleküls TNF- α

Wie bereits zuvor beschrieben, konnte das Zielmolekül TNF- α unabhängig vom angewendeten Behandlungsschema mit Etanercept zum Zeitpunkt des Versuchsendes an Tag 21 nach der Immunisierung kaum in Zellkulturüberständen der Milz via ELISA detektiert werden. Auch der mittels Multiplex Bead Assay bestimmte TNF- α -Gehalt in den okulären Geweben war zu diesem Zeitpunkt nur auf einem niedrigen Niveau. Daher wurde in weiteren Untersuchungen der Anteil von TNF- α -positiven Zellen in Einzelzellsuspensionen der Milz für die verschiedenen Behandlungsschemata mit durchflusszytometrischen Methoden analysiert. Da T-Zellen und Makrophagen bedeutende Produzenten von TNF- α sind, wurden CD4 bzw. F4/80 als Oberflächenmarker der Milzzellen mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Durch eine anschließende Permeabilisierung der Zellen und den Einsatz Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper gegen TNF- α wurde eine intrazelluläre TNF- α -Färbung durchgeführt. Bei Betrachtung der gesamten PBS-Kontrollen aller Versuchsreihen mit verschiedenen Behandlungsschemata betrug der durchschnittliche Anteil TNF- α -positiver Zellen unter den CD4+ Milzzellen $30,7 \pm 11,3$ %. Der durchschnittliche Anteil TNF- α -positiver Zellen unter den F4/80+ Milzzellen

betrug $24,2 \pm 13,4$ %. Bei Ermittlung der Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten zur systemischen Etanercept-Behandlung in der afferenten Phase ergab sich eine leichte Reduktion des Anteils TNF- α -positiver Zellen unter den CD4+ und F4/80+ Milzzellen in der Etanercept-Gruppe im Vergleich zur PBS-Kontrolle (Tabelle 5). Dieser Trend konnte überwiegend auch bei den Versuchsreihen zu den anderen Behandlungsschemata beobachtet werden. Nur nach der systemischen oder subkonjunktivalen Etanercept-Behandlung in der efferenten Phase war der Anteil von TNF- α positiven CD4+ Zellen der Milz in der Etanercept-Gruppe erhöht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Anteil TNF- α positiver Zellen von CD4+ und F4/80+ Zellen in der Milz

Injektion	Phase	Zelltyp	Gruppe	TNF- α positiv [%]
Intraperitoneal	Afferenz	CD4+	Etanercept	27,1
			PBS	32,3
		F4/80+	Etanercept	11
			PBS	21,7
	Efferenz	CD4+	Etanercept	46,4
			PBS	21,7
F4/80+		Etanercept	10,7	
		PBS	16,4	
Intravitreal	Afferenz	CD4+	Etanercept	46,4
			PBS	51,3
		F4/80+	Etanercept	21,02
			PBS	45,7
	Efferenz	CD4+	Etanercept	30,9
			PBS	32,4
F4/80+		Etanercept	17,4	
		PBS	26,5	
Subkonjunktival	Afferenz	CD4+	Etanercept	17,1
			PBS	20,1
		F4/80+	Etanercept	6
			PBS	10,6
	Efferenz	CD4+	Etanercept	42,1
			PBS	26,2

Zur qualitativen Detektion von TNF- α im Auge wurde eine immunhistochemische Färbung von TNF- α an Tag 21 nach der Immunisierung auf Gewebeschnitten des Auges durchgeführt. Bei einem entzündeten Auge mit deutlichen EAU-Zeichen konnte eine diffuse Verteilung der Färbung über die gesamte Retinabreite beobachtet werden, die besonders prominent in den plexiformen Schichten auftrat. Auch im Gewebe des Sehnervs konnte eine Färbung beobachtet werden. Es lag kein positives Farbsignal inmitten des Entzündungsinfiltrates vor (Abb.27).

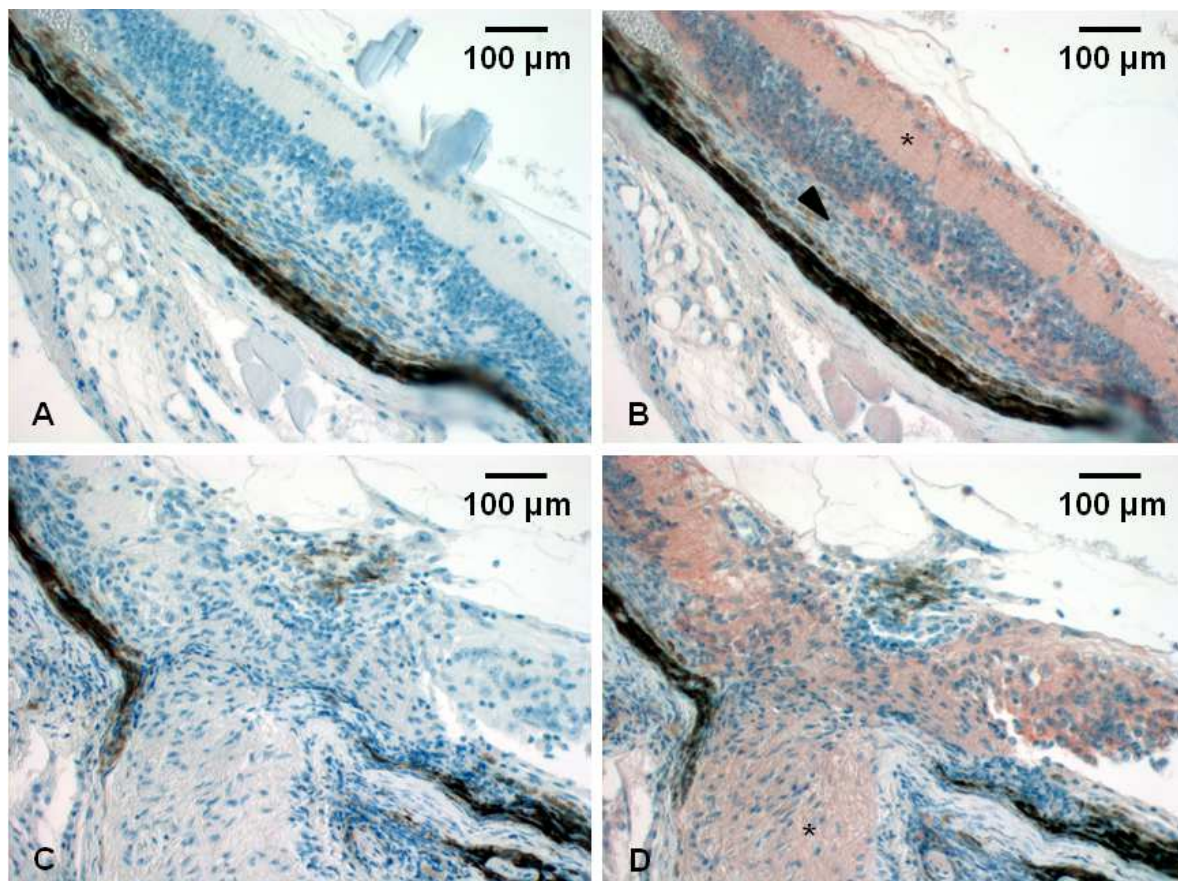


Abb. 27: Immunhistochemische Färbung von TNF- α (rot-braun) auf Gewebeschnitten des Auges. Kernfärbung (blau) mit Hämatoxylin. **A** und **C**: Negativkontrollen (Inkubation ohne primären Antikörper gegen TNF- α). **B**: Positive Färbung in der inneren plexiformen Schicht der Retina (*), nicht aber im Entzündungsinfiltrat (Dreieck). **D**: Positive Färbung im Sehnerv (*).

Auch in Augen, die nur sehr geringfügige Entzündungszeichen aufwiesen, konnte das in Abb. 27 B dargestellte Färbemuster der Retina beobachtet werden. Es wurden keine Unterschiede im Färbemuster zwischen Etanercept-behandelten Tieren und Kontrolltieren festgestellt.

4. Diskussion

4.1 Effekte der systemischen Etanercept-Applikation in der afferenten und der efferenten Phase

Verschiedene Studien zeigen eine wichtige Rolle von TNF- α bei autoimmunen Entzündungsprozessen auf. Bei einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) war die TNF- α -Expression von in das zentrale Nervensystem infiltrierender Leukozyten und parenchymaler Mikroglia-Zellen erhöht (Renno et al. 1995; Tanuma et al. 1997). Zudem konnte die Entmarkung und weitere, typische, morphologische Eigenschaften der EAE durch die Injektion von TNF- α -neutralisierenden Wirkstoffen bei Mäusen verhindert werden (Selmaj et al. 1991; Selmaj et al. 1995). Weitere Studien zeigen jedoch auch neuroprotektive Funktionen von TNF- α im zentralen Nervensystem und eine Beteiligung an regenerativen Prozessen auf, die über den TNF-R2 vermittelt werden (Arnett et al. 2001; Caminero et al. 2011). Möglicherweise damit in Zusammenhang stehend wurde nach dem Einsatz von TNF-Inhibitoren bei Multiple Sklerose Patienten von einer Verstärkung der Erkrankung berichtet (van Oosten et al. 1996; The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group 1999). Daher stellt die Erkrankung Multiple Sklerose eine Kontraindikation für die Anwendung von TNF-Inhibitoren bei z.B. anderen autoimmunen Entzündungserkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn oder Psoriasis dar, an deren Pathogenese TNF- α eine entscheidende Beteiligung zugesprochen wird (Yamamoto & Rose-John 2012; Bradley 2008; Kollias et al. 1999).

Auch für den Ablauf einer experimentellen sowie klinischen Uveitis ist eine bedeutende pathologische Rolle von TNF- α beschrieben worden (Dick et al. 2004; Ooi et al. 2006). Wurde Mäusen bei der aktiven Immunisierung mit IRBP und CFA zusätzlich rekombinantes TNF- α injiziert, war die resultierende EAU in Schwere und Inzidenz erhöht. Damit hatte TNF- α einen verstärkenden Effekt auf die Immunantwort gegen IRBP (Nakamura et al. 1994). Die systemische Blockade von TNF- α führte bei EAU zu einem verzögerten Einsetzen klinischer Entzündungszeichen und zu einer verminderten strukturellen Beschädigung der beteiligten okulären Gewebe (Dick et al. 1996; Dick et al. 1998; Hankey et al. 2001). In einer weiteren Studie waren der EAU-Schweregrad, die antigenspezifische Proliferation von Lymphozyten sowie die DTH-Reaktion nach der systemischen Applikation von polyklonalen Antikörpern gegen TNF- α in der afferenten Phase reduziert. Die Autoren legten nahe, dass die Neutralisation von TNF- α die Initiierung (englisch: Priming) antigenspezifischer Effektor-T-Zellen hemmt (Sartani et al. 1996). Auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zur

Anwendung verschiedener Behandlungsschemata mit Etanercept im EAU-Modell weisen auf eine primäre Rolle von TNF- α in der Induktionsphase der EAU, nicht aber in der efferenten, klinischen Phase der Erkrankung hin. Darüber hinaus war auch hier der reduzierte EAU-Schweregrad nach systemischer Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase von einer reduzierten antigenspezifischen Proliferation von Milzzellen und deren verringerten antigenspezifischen Produktion proinflammatorischer Zytokine begleitet. Dies steht in Einklang mit *in vitro* Experimenten, die eine verstärkte antigen- und mitogeninduzierte Proliferation von reifen T-Zellen bei Inkubation mit rekombinantem TNF- α zeigten (Yokota et al. 1988), während die proliferative Aktivität von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC; englisch: peripheral blood mononuclear cells) nach allogener Stimulation mit Mitomycin C behandelten PBMC durch TNF- α -bindende Antikörper unterdrückt wurde (Shalaby et al. 1988). Bei der Etablierung des EAU-Modells in der hier vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Emulsion von IRBP und CFA durch die Behandlung mit Ultraschall eine zähe, cremartige Konsistenz bekam. Mit dieser Vakzine wurde eine sehr starke EAU ausgelöst, sodass bei einem hohen Anteil der Tiere eine vollständige Zerstörung der gesamten Netzhaut vorlag. Während der EAU-Schweregrad bei einer leichteren Modellinduktion durch die Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase reduziert war, hatte die Etanercept-Behandlung keinen Einfluss auf diese schwere Form der EAU, die durch die ultraschallbehandelte IRBP/CFA Emulsion ausgelöst wurde. Es wurde bereits eine frühere Arbeit publiziert, bei der der protektive Effekt der TNF- α -Inhibition auf die histopathologischen EAU-Zeichen verloren ging, wenn die Dosis des immunisierenden Antigens erhöht wurde (Robertson et al. 2003). Möglicherweise erhöht auch die Ultraschallbehandlung der IRBP/CFA Emulsion die Antigenexposition, da diese hoch visköse Emulsion länger an der Injektionsstelle verblieb.

Eine Studie von Luger et al. beschreibt einen reduzierenden Einfluss TNF- α -neutralisierender Antikörper auf eine EAU, die durch den adoptiven Transfer von uveitogenen Th1-Zellen induziert wurde (Luger et al. 2008). Im Gegensatz dazu zeigten die Daten der hier vorliegenden Arbeit einen verbessernden Einfluss der TNF- α -Inhibition durch Etanercept auf die EAU in der afferenten Phase, nicht aber bei Behandlung in der klinischen, efferenten Phase nach der aktiven Immunisierung und auch nicht im adoptiven Transfer als gezieltes Modell für die klinische Situation. Dies spricht für die Hypothese, dass Etanercept mehr auf der Ebene der Generierung und Entwicklung uveitogener Effektorzellen wirkt als auf bereits differenzierte, antigenspezifische T-Zellen, die durch die Exposition zu dem Uveitogen schon aktiviert und gefördert wurden.

Bei der Generierung der antigenspezifischen Effektor-T-Zellen spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle, die durch Zytokine wie IFN- γ und TNF- α in dem proinflammatorischen Milieu am Ort der Immunisierung aktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Makrophagen durch den Entzündungsreiz in der Peripherie eine Art Programmierung erfahren, die ihre Effektorfunktionen festlegen, die sich auch bei verändertem Milieu nicht mehr umstellen (Erwig et al. 1998; Robertson et al. 2002). Es wurde postuliert, dass solche programmierten Makrophagen, die in das Auge einwandern, die immunregulatorischen Effekte von TGF- β aus der posterioren Augenkammer übermannen können. Während ortständige Makrophagen, die aus einer nicht entzündeten Retina isoliert wurden, auch nach Inkubation mit IFN- γ und TNF- α *ex vivo* nur minimale Mengen an Stickoxid produzierten, war die hohe Stickoxidproduktion von in das Auge eingewanderten Makrophagen, die zum Höhepunkt der EAU (Zeitpunkt der stärksten Infiltration) aus der Retina isoliert wurden, durch die Inkubation mit TGF- β nicht reduziert. Zudem hatte auch die *ex vivo* Inkubation mit einem löslichen TNF-Rezeptor/IgG-Fusionsprotein keinen Einfluss auf die Stickoxid-Produktion der infiltrierenden Makrophagen (Robertson et al. 2002). Von diesem Blickpunkt aus kann kein Einfluss von der TNF- α -Inhibition in der efferenten Phase des EAU-Modells auf den Aktivierungsstatus von Makrophagen und der folgenden Generierung der Effektor-T-Zellen erwartet werden. Nachdem die initialen Aktivierungsprozesse in der Induktionsphase abgelaufen sind, schien die Blockade von TNF- α durch Etanercept in der hier vorliegenden Studie unzureichend, um Entzündungsreaktionen im Auge zu unterdrücken. Auch die Effektorantwort, gemessen in der antigenspezifischen Proliferation von Milzzellen an Tag 21 nach der aktiven Immunisierung, wurde durch die systemische Applikation von Etanercept in der efferenten Phase nicht reduziert. Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil TNF- α -positiver Milzzellen unabhängig vom angewendeten Etanercept-Behandlungsschema und dessen Auswirkung auf den EAU-Schweregrad in den meisten Fällen bei der Etanercept-Gruppe reduziert (siehe Tabelle 5; S.109). Durch antigenspezifisch stimulierte Milzzellen sezerniertes TNF- α konnte an Tag 21 nach der Immunisierung auch bei nicht Etanercept-behandelten Kontrolltieren hingegen kaum detektiert werden (via ELISA). Dies spricht für eine untergeordnete Rolle von TNF- α in dieser späten Phase des EAU-Modells. In einer weiteren Studie konnte auch im Auge die maximale TNF- α -Expression (gemessen im mRNA-Level von TNF- α) während der frühen Phase sowie der Höchstphase der EAU detektiert werden. Anschließend nahm die TNF- α -Expression wieder ab (Sun et al. 2000, Exp Eye Res 70). Im Gegensatz zu dem sehr akuten und monophasischen EAU-Verlauf bei der B10.RIII-Maus (Hankey et al. 2001), treten bei Uveitis-Patienten häufig wiederkehrende Entzündungsschübe

auf. Letzteres legt periodische Zyklen der Generierung und Aktivierung uveitogener Effektorzellen nahe, auf die Etanercept einwirken könnte. Klinische Studien zeigen teilweise einen Behandlungserfolg mit Etanercept bei Uveitis-Patienten (Reiff et al. 2001; Saurenmann et al. 2006). In einer weiteren klinischen Studie wurde beobachtet, dass Patienten mit wiederkehrenden Uveitis-Schüben höhere TNF- α -Spiegel im Serum aufwiesen als Patienten, die erstmalig unter einem Uveitisschub litten (Santos Lacomba et al. 2001). In diesem Zusammenhang könnte die Auswertung von Patientendaten möglicherweise Aufschluss darüber geben, ob besonders jene Patienten auf Etanercept ansprechen, die eine Uveitis mit rezidivierender Verlaufsform haben. Ein solcher Zusammenhang könnte die Hypothese untermauern, dass Etanercept in erster Linie auf der Ebene der Generierung uveitogener Effektorzellen wirkt.

Allerdings liegen andere Studien zur TNF- α -Neutralisation durch ein p55-TNF-Rezeptor/Ig-Fusionsprotein bei Ratten und B10.RIII-Mäusen vor, die sowohl bei Behandlung in der afferenten als auch in der efferenten Phase des Modells einen reduzierenden Effekt auf die EAU zeigen. Trotz einer unveränderten Einwanderung von spezifischen CD4⁺ Effektor-T-Zellen in die Retina war die strukturelle Zerstörung der okulären Gewebe vermindert, was auf die Blockade von TNF- α -vermittelten Effektorfunktionen der entsprechenden CD4⁺ Zellen zurückgeführt wurde (Dick et al. 1996; Hankey et al. 2001).

Etanercept ist ein Fusionsprotein aus dem Fc-Fragment eines Antikörpers und der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des 75-kDa-TNF-Rezeptors (TNF-R2) (Mohler et al. 1993; Scallon et al. 2002). Der TNF-R2 bildet relativ instabile Komplexe mit seinem Ligand, die durch hohe Assoziations- und Dissoziationsraten gekennzeichnet sind. Nach dem sogenannten „Ligand passing“ Modell bindet der TNF-R2 TNF- α , um es bald darauf wieder freizusetzen und die Bindung an einen p55-TNF-Rezeptor (TNF-R1) zu dirigieren. Die stabilere Bindung an den TNF-R1 vermittelt letztlich die Signaltransduktion (Tartaglia et al. 1993). Dementsprechend wurden auch bezüglich Etanercept und TNF- α relativ instabile Komplexe beschrieben. Nach einer Bindung an Etanercept konnte TNF- α wieder freigesetzt werden, wobei TNF- α nach der Dissoziation noch immer eine bioaktive Wirkung hatte (Evans et al. 1994; Scallon et al. 2002). Damit in Einklang steht die Wirkung von Etanercept auf den TNF- α -Bioassay in der hier vorliegenden Arbeit. Während nach 16-stündiger Inkubation von L929-Zellen mit TNF- α fast ausschließlich tote Zellen vorlagen, lebte der Großteil der Zellen nach zusätzlicher Inkubation mit Etanercept, was zeigt, dass Etanercept die biologische Wirkung von murinem TNF- α blockiert. Bereits zuvor wurde beschrieben, dass Etanercept murines TNF- α mit einer ähnlichen Affinität bindet wie humanes TNF- α (Scallon et al. 2002).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch der Schutz der L929-Zellen durch Etanercept vor dem lysierenden Effekt von TNF- α bei einer länger andauernden Inkubation nicht aufrechterhalten. Zu einem späteren Zeitpunkt war auch bei Inkubation mit Etanercept ein größerer Teil der L929-Zellen nekrotisch bzw. apoptotisch im Vergleich zu L929-Zellen, die ausschließlich mit RPMI und Actinomycin D inkubiert wurden. Dies spricht für eine Induktion des Zelltods in L929-Zellen durch TNF- α nach der Dissoziation von Etanercept. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass die löslichen Formen der TNF- α -Rezeptoren durch ihre Bindung an TNF- α dessen Degradierung verhindern und damit die biologische Lebensdauer verlängern können. Die löslichen TNF- α -Rezeptoren stellen damit nicht nur natürlich vorkommende TNF- α -Antagonisten, sondern auch eine Art Reservoir von TNF- α dar und spielen damit eine regulatorische Rolle bei Entzündungsreaktionen (Aderka et al. 1992a). Demnach kann auch für Etanercept angenommen werden, dass es auf der einen Seite zwar die biologische Wirkung von TNF- α blockiert, diese auf der anderen Seite aber auch für einen verlängerten Zeitraum konserviert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der TNF-R2 durch seine Bindung an die membranständige Form von TNF- α Signalwege in der TNF- α -exprimierenden Zelle induziert, was auch als „reverse signaling“ bezeichnet wird. So war die Sekretion von TNF- α durch Monozyten bei der Interaktion der membranständigen Form von TNF- α auf der Oberfläche der Monozyten mit dem TNF-R2 auf der Oberfläche transfizierter und fixierter T-Zellen, die diesen Rezeptor überexprimierten, erhöht (Rossol et al. 2007). Auch die Inkubation mit Etanercept löste den reversen Signalweg in Monozyten aus und führte zu einer Induktion der TNF- α -Produktion. Im Gegensatz zu Etanercept blockieren Anti-TNF- α -Antikörper diesen reversen Signalweg durch die Bindung an die membranständige Form von TNF- α (Rossol et al. 2007; Heiligenhaus et al. 2010). Diese beschriebenen Eigenschaften von Etanercept könnten die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen und den Studien von Dick et al. 1996, Hankey et al. 2001 und Luger et al. 2008 erklären.

Es kann an dieser Stelle im Zusammenhang mit der stabileren Bindung zwischen TNF- α und dem p55-TNF-Rezeptor spekuliert werden, ob ein auf dem p55-TNF-Rezeptor basierendes Fusionsprotein möglicherweise einen effektiveren Wirkstoff zur TNF- α Inhibition darstellen würde als Etanercept. Ein solcher TNF- α -Inhibitor wurde bereits in einer klinischen Studie zur Behandlung einer nicht infektiösen intraokularen Entzündungserkrankung des hinteren Augenabschnittes erfolgreich eingesetzt (Murphy et al. 2004). Nach der Anwendung von Lenercept, einem Medikament in Form eines p55-TNF-Rezeptor/IgG1(Fc)-Fusionsproteins

bei RA-Patienten in verschiedenen klinischen Studien wurde dessen weitere Entwicklung zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis allerdings eingestellt (Keystone 2002).

4.2 Effekte der intraokulären TNF- α -Inhibition durch Etanercept

Verschiedene Studien deuten auf eine wichtige Rolle von ortständigen Zellen des Auges beim Ablauf von pathologischen, intraokularen Entzündungsprozessen hin. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass residente, okuläre Zellen zum einen Moleküle exprimieren, die mit professioneller Antigen-Präsentation assoziiert sind (Mano et al. 1991; Matsubara et al. 1999) und zum anderen an der Reaktivierung von in das Auge einwandernden, autoreaktiven T-Zellen beteiligt sind (Jiang et al. 2008). Auch die lokale Produktion von TNF- α durch residente, okuläre Zellen sowie die Induktion der TNF- α -Expression bei rekrutierten, infiltrierenden Zellen wurde beschrieben (Rao et al. 2003; Jiang et al. 2008). Die *in vitro* Sekretion von TNF- α durch verschiedene Zelltypen der Retina nach Stimulation stellte sich bei Ratten, die für intraokuläre Entzündungserkrankungen wie EAU und EIU empfänglich waren, als erhöht heraus im Vergleich zu nicht suszeptiblen Ratten (De Kozak et al. 1994). Darüber hinaus zeigten *in vivo* Studien, dass der intraokuläre TNF-Spiegel und die Expression von TNF- α im Auge während des EAU-Verlaufs erhöht sind (Okada et al. 1998; Foxman et al. 2002). Eine Rolle von lokal produziertem TNF- α bei okulären Entzündungsprozessen wird zudem dadurch gestützt, dass die intravitreale Injektion von rekombinantem TNF- α zu entzündlichen Veränderungen führte, die durch eine Schrankenstörung, einen Anstieg des Proteingehaltes in den okulären Flüssigkeiten und eine von Monozyten dominierte Zellinfiltration in Vorderkammer und Iris charakterisiert waren. Die TNF- α induzierte Uveitis hatte bezogen auf den bedeutenden Anteil mononukleärer Zellen an dem Entzündungsinfiltrat und die länger andauernde aktive Entzündung eher chronische Eigenschaften und unterschied sich damit von einer Endotoxin-induzierten Uveitis (Rosenbaum et al. 1988; Fleisher et al. 1990).

Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit durch die intravitreale Applikation von Etanercept untersucht, inwieweit auch eine lokale TNF- α -Inhibition am Ort der Entzündung und der pathologischen Gewebeveränderung einen Einfluss auf die EAU hat.

Wie nach der systemischen Applikation auch konnte nur nach der intravitrealen Injektion von Etanercept in der afferenten Phase, nicht aber in der efferenten Phase des Modells ein reduzierter EAU-Schweregrad beobachtet werden. In Übereinstimmung konnte auch in einer im Jahre 2009 veröffentlichten Studie eine Besserung der EAU durch eine intraokuläre TNF- α Blockade während der frühen Phase der Immunantwort erzielt werden (Kowalczyk et al.

2009). In dieser Studie wurde die TNF- α -Inhibition durch eine Transfektionstechnik erreicht, wobei ein Plasmid in den Ziliarmuskel injiziert und durch Elektrotransfer in dieser Ringmuskulatur verteilt wurde. Das Plasmid kodierte ein Fusionsprotein der löslichen Form des humanen p55-TNF-Rezeptors mit dem Fc-Fragment eines IgG1-Moleküls der Maus. Dieser TNF-Inhibitor wurde von den Zellen des Ziliarmuskels über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen exprimiert und in das Augeninnere sezerniert. Die höchsten Konzentrationen wurden sechs bis acht Tage nach dem Transfer, das bedeutet vier Tage nach der Immunisierung und demnach auch in der afferenten Phase des Modells, detektiert (Bloquel et al. 2006; Kowalczyk et al. 2009). Als Wirkmechanismus der intraokulären Blockade von TNF- α vermuteten die Autoren eine Verschiebung der Immunreaktion in Richtung einer Th2-dominierten Effektorantwort, was von dem Profil der intraokulären Zytokine abgeleitet wurde (Kowalczyk et al. 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnten nur geringfügige Unterschiede im Gehalt der unterschiedlichen, intraokulären Zytokine zwischen der Etanercept-Gruppe und der Kontrollgruppe nach intravitrealer Wirkstoffapplikation beobachtet werden und es lag keine Verschiebung des Profils intraokulärer Zytokine bei der Behandlungsgruppe vor. Vielmehr war der intraokuläre Gehalt der verschiedenen Zytokine im injizierten Auge tendenziell leicht erhöht gegenüber dem unbehandelten Auge, was sowohl für die Etanercept-Gruppe als auch für die Kontrollgruppe galt. Dies spricht dafür, dass allein durch die Injektion in das Auge ein Reiz gesetzt wird, der zu einer vermehrten lokalen Zytokinproduktion führt und die potentiell modulatorischen Effekte des Wirkstoffes überlagert. Möglicherweise stellt die von Kowalczyk et al. beschriebene einmalige Injektion des Plasmids in den Ziliarmuskel und der anschließende Elektrotransfer eine weniger invasive Applikationsmethode dar, was die Unterschiede im beobachteten Profil intraokulärer Zytokine nach intraokulärer TNF- α -Blockade zu der hier vorliegenden Arbeit erklären könnte. Zudem gewährleistete das Transfektionsmodell eine stetige Wirkstofffreisetzung über einen längeren Zeitraum, was eine effektivere lokale Immunmodulation bedeuten könnte.

Allerdings war in der hier vorliegenden Arbeit nach der intravitrealen Injektion von Etanercept in der afferenten Phase die antigenspezifische Produktion des zentralen Th1-Zytokins IFN- γ von Milzzellen reduziert, während die Th2-assoziierten Zytokine IL-6 (signifikant) und IL-10 (tendenziell) erhöht waren. Da das zentrale Th2-Zytokin IL-4 sowohl in der Etanercept-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe nur geringfügig ausgeschüttet wurde, konnte keine typische Th2-Antwort bei der Etanercept-Gruppe, aber die Verschiebung zu einer Immunantwort mit Th2-assoziierten Elementen detektiert werden. Es gibt Hinweise

dafür, dass eine Th1-dominierte und eine Th2-dominierte Immunantwort zwei antagonistische Immunreaktionen darstellen, da das zentrale Th1-Zytokin IFN- γ Th2-Zellen inhibiert (Gajewski & Fitch 1988) und gleichzeitig die Differenzierung von Th1-Zellen fördert (Scott 1991), während das Th2-assoziierte Zytokin IL-10 die Zytokinproduktion von Th1-Zellen hemmt (Mosmann & Moore 1991) und neben IL-4 die Differenzierung oder Entwicklung von Th2-Zellen vorantreibt (Swain et al. 1990; Howard & O'Garra 1992). Verschiedene Studien haben bereits eine schützende Funktion der Aktivierung von Th2-Zellen und ihren assoziierten Zytokinen auf eine EAU beschrieben. So wurde beispielsweise gezeigt, dass IL-10 einen protektiven Einfluss auf eine EAU hat. Die Applikation von rekombinantem IL-10 unterdrückte die Entwicklung einer Th1-spezifischen Effektorantwort und verbesserte den EAU-Schweregrad, während eine Neutralisation von IL-10 die EAU-Merkmale verstärkte (Rizzo et al. 1998). In einer weiteren Studie waren Ratten, bei denen durch die Injektion von Quecksilberchlorid eine präferierte Aktivierung von Th2-Zellen und damit eine dominierende Expression von IL-4 in den Lymphknoten induziert wurde, vor einer EAU geschützt (Saoudi et al. 1993). Zudem wurde bei Mäusen auch ein Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität für eine EAU und der genetisch bedingten Generierung einer polarisierten T-Zell-Antwort beobachtet. In der Ausgangssituation (eine Woche nach der Immunisierung) wiesen beide Mausstämme (resistent und suszeptibel) ein ausbalanciertes Zytokinprofil mit Th1- und Th2-Elementen auf. Der EAU-suszeptible Mausstamm (B10.A) entwickelte auf das immunisierende Antigen hin eine in Richtung Th1-polarisierte Immunresponse, während EAU-resistente Mäuse (Balb/c) eine T-Zell-Antwort generierten, die einem Th2-Profil entsprach (Sun et al. 1999). Trotz eines reduzierten EAU-Schweregrades, wurde in dem Kontext einer Th2-dominierten Immunantwort eine nahezu unbeeinträchtigte antigenspezifische Proliferation detektiert (Saoudi et al. 1993; Sun et al. 1999). Damit übereinstimmend war die unveränderte antigenspezifische Proliferation von Milzzellen nach intravitrealer Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase bei der hier vorliegenden Arbeit. Auf die antigenspezifische IL-17-Produktion von Milzzellen zeigte die intravitreale Etanercept-Behandlung in der afferenten Phase keinen erheblichen Einfluss. Im Gegensatz dazu war nach der systemischen Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase unter den verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen auch die Produktion von IL-17 als zentrales Zytokin uveitogener Th17-Zellen verringert. Dies steht mit den Ergebnissen einer aktuellen Studie in Einklang, die eine Hemmung der Differenzierung von Th17-Zellen bei einer systemischen Anti-TNF- α -Therapie von Patienten mit einer BD-assoziierten Uveitis aufzeigt (Sugita et al. 2012). Die Rolle von Th17-Zellen bei Uveitis wird in einem späteren Abschnitt

dieser Arbeit (siehe Abschnitt 4.8) noch einmal aufgegriffen und im Zusammenhang mit neuen Zielmolekülen für lokale Behandlungsansätze bei autoimmuner Uveitis diskutiert.

4.3 Reduktion des EAU-Schweregrades im kontralateralen Auge

Nach der intravitrealen Injektion von Etanercept in der afferenten Phase konnte auch eine Reduktion des EAU-Schweregrades im nicht injizierten, kontralateralen Auge beobachtet werden, die nahe an der Grenze zum Signifikanzniveau lag. Bislang ist der zugrundeliegende Mechanismus für diese Tendenz nicht klar. Es könnte spekuliert werden, dass intravitreal appliziertes Etanercept über eine Wirkung in der Milz zu einem geringeren EAU-Schweregrad im kontralateralen Auge führt. Die durchflusszytometrischen Analysen zur Aufnahme und Kinetik von FITC-markierten KON nach intravitrealer Injektion zeigten das Auftreten von FITC-positiven Zellen in der Milz. Während sich die negativ geladenen, in TE-Puffer gelösten Oligonukleotide jedoch eher wie ein Salz verhalten, handelt es sich bei Etanercept um ein Protein. Ob auch intravitreal injiziertes Etanercept in die Milz gelangt, müssten weitere Experimente zeigen. In einer Studie zur Transfektion von Ziliarmuskelzellen mit einem Plasmid, was für ein Fusionsprotein des p55-TNF-Rezeptors mit dem Fc-Fragment eines IgG-Moleküls kodierte, wurde das Expressionsprodukt lokal im Augeninneren produziert und konnte anschließend allerdings nicht im Serum detektiert werden (Bloquel et al. 2006). In einer anderen Studie zur Pharmakokinetik und Verteilung eines TNF- α -Antagonisten in den okulären Geweben nach topischer Gabe konnte gezeigt werden, dass beträchtliche Spiegel des Wirkstoffes auch im Vitreus, der Retina und der Choroidea des kontralateralen, unbehandelten Auges auftraten. Dabei penetrierte der Wirkstoff in Form des antigenbindenden Fragments eines Antikörpers von 26 kDa (ESBA105) nach der topischen Gabe wahrscheinlich über den Limbus direkt in den posterioren Bereich des Auges und gelangte vielmehr über einen lokalen Migrationsweg in das kontralaterale, unbehandelte Auge als indirekt über die Blutzirkulation (Furrer et al. 2009). Allerdings erscheint ein solcher Mechanismus für Etanercept mit einer relativen Molekülmasse von ca. 150 kDa als unwahrscheinlich. Zudem konnte auch das im Inneren eines Auges produzierte Fusionsprotein in dem von Bloquel beschriebenen Transfektionsmodell nicht im kontralateralen Auge detektiert werden (Bloquel et al. 2006). Analysen zum qualitativen Nachweis von Etanercept im Serum sowie den okularen Geweben des kontralateralen Auges könnten weiteren Aufschluss über die systemische Exposition und die Pharmakokinetik nach intravitrealer Applikation und damit zum Wirkmechanismus geben.

Die Reduktion des EAU-Schweregrades war nach systemischer Etanercept-Applikation effektiver als nach der intravitrealen Wirkstoffgabe, was unter der Prämisse einer

systemischen Exposition nach intravitrealer Etanercept-Injektion möglicherweise mit dem Einsatz einer geringeren Dosis von Etanercept bei Anwendung des intravitrealen Behandlungsschemas zusammenhing. Das Etanercept wurde in Pulverform bezogen. Die Erstellung der Injektionslösung erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend mit dem bereitgestellten Wasser für Injektionszwecke. Daher waren 50 µg die maximale Dosis, die durch die Injektion von 2 µl der Etanercept-Stocklösung intravitreal appliziert werden konnte. Wie bereits zuvor beschrieben (Abschnitt 3.5.1), schien die Punktion des Auges im Zuge der intravitrealen Injektion einen Einfluss auf den Zytokingehalt in den okulären Geweben zu haben. Um die Traumatisierung des Auges und experimentelle Artefakte durch die intravitrealen Injektionen möglichst gering zu halten, wurde bei der intravitrealen Wirkstoffapplikation im Vergleich zur systemischen Gabe in der afferenten Phase ein Injektionszeitpunkt ausgespart. Die Zeitspanne der Behandlung war hingegen gleich.

Der tendenziell reduzierte EAU-Schweregrad im nicht injizierten Auge nach intravitrealer Wirkstoffapplikation scheint nicht auf einen Rückfluss des Wirkstoffes in die Konjunktiva des Auges und das umliegende Bindegewebe nach der intravitrealen Injektion zurückzuführen zu sein, da der EAU-Schweregrad durch die subkonjunktivale Wirkstoffapplikation unabhängig von der Phase des Modells nicht beeinflusst wurde. Die durchflusszytometrischen Analysen zur Aufnahme und Kinetik von FITC-markierten KON signalisierten einen raschen Abtransport von subkonjunktival injiziertem Wirkstoff über die in der Kehlgegend über den Speicheldrüsen sowie seitlich davon gelegenen Lymphknoten, die von dem das Auge umliegenden Gewebe abführen. Dies spricht unter den hier zugrundeliegenden experimentellen Bedingungen für eine untergeordnete Rolle dieser regionalen, abführenden Lymphknoten bei der Kinetik von Entzündungszellen und immunologischen Prozessen im Zuge der EAU. Es konnte zudem unabhängig von der Behandlungsgruppe und vom Behandlungsschema keine erhöhte Proliferation der Zellen dieser regionalen Lymphknoten nach antigenspezifischer Stimulation im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in einem anderen Tiermodell zu einer herpetischen stromalen Keratitis (HSK), bei der eine virale Infektion und damit auch Antigenexposition in der Kornea erfolgt, eine starke antigenspezifische Proliferation dieser regionalen Lymphknoten gemessen (Bauer et al. 2002). Im EAU-Modell sind es die inguinalen und iliakalen Lymphknoten, die von dem subkutanen Gewebe der Immunisierungsstellen abführen. Es liegen Studien zu verschiedenen Immunisierungsschemata bei der EAU-Induktion vor, die eine deutliche antigenspezifische Proliferation von Zellen der inguinalen und iliakalen Lymphknoten in der späten Phase der EAU an Tag 21 nach der Immunisierung

zeigen. Dabei hatte die Proliferation von Zellen aus den Lymphknoten und der Milz ein ähnliches Ausmaß (Silver et al. 1999; Avichezer et al. 2000). Das Ergebnis einer erhöhten Proliferation von antigenspezifisch stimulierten Milzzellen im Vergleich zu nicht stimulierten Milzzellen konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet werden. In einer weiteren Studie konnte nach der Immunisierung mit IRBP nur in der frühen Induktionsphase der EAU eine deutliche antigenspezifische Proliferation von Zellen der inguinalen Lymphknoten festgestellt werden, die in der späteren Phase vor der Rückbildung der EAU wieder abnahm. In dieser späten Phase wurde hingegen eine erhöhte antigenspezifische Proliferation der Milzzellen gemessen. Es wurde angenommen, dass IRBP-spezifische T-Zellen nach der Proliferation in den inguinalen Lymphknoten während der Induktionsphase der EAU vor Einsetzen der Resolutionsphase in die Milz migrieren (Takeuchi et al. 2001). Desweiteren wurde im Zusammenhang mit einem Modell zur Induktion neonataler Toleranz gegenüber Proteinantigenen beschrieben, dass T-Gedächtniszellen im Gegensatz zu T-Effektorzellen den Rezeptor L-Selektin herunterregulieren und damit die Fähigkeit verlieren, in die Lymphknoten zu migrieren. Die Migration in die Milz war hingegen unabhängig von L-Selektin (Forsthuber et al. 1996). Im IRBP-induzierten EAU-Modell in B10.RIII-Mäusen setzt bereits an Tag 21 nach der Immunisierung die Resolutionsphase der EAU ein (Jiang et al. 1999). Möglicherweise wurde die antigenspezifische Proliferation, die in dieser späten Phase bei Zellen aus der Milz, nicht aber bei Zellen aus den vom Auge abführenden Lymphknoten in der hier vorliegenden Arbeit gemessen wurde, in erster Linie durch T-Gedächtniszellen generiert. Es bedarf allerdings weiterer Experimente und durchflusszytometrischer Analysen, die eine Diskriminierung von Effektorzellen und Gedächtniszellen in der proliferierenden Zellpopulation der Milz erlauben, um diese Hypothese zu unterstützen.

4.4 Unterschiedliche Wirkmechanismen von systemisch und intravitreal appliziertem Etanercept

An dieser Stelle kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die Reduktion des EAU-Schweregrades nach intravitrealer Applikation von Etanercept in der afferenten Phase im Gegensatz zur systemischen Behandlung mit Etanercept nicht von einer verringerten antigenspezifischen Proliferation der Milzzellen begleitet war. Auch im Muster der antigenspezifischen Zytokinproduktion durch Milzzellen bestand ein Unterschied zwischen der intravitrealen und der systemischen Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase. Nach der intravitrealen Etanercept-Applikation war das zentrale Th1-Zytokin IFN- γ

signifikant reduziert, während die Th2-assoziierten Zytokine IL-6 (signifikant) und IL-10 (tendenziell) erhöht waren. Nach der systemischen Behandlung mit Etanercept hingegen konnte der Trend einer Reduktion verschiedenster proinflammatorischer Zytokine beobachtet werden. Dieser Trend lag auch im Zytokingehalt der okulären Gewebe vor. Obschon dabei die Unterschiede zwischen der Etanercept-Gruppe und der PBS-Kontrolle nicht das statistische Signifikanzniveau erreichten, untermauern diese Daten zum Zytokingehalt der okulären Gewebe die Ergebnisse zur antigenspezifischen *in vitro* Zytokinproduktion von Milzzellen.

Diese Unterschiede im Muster der antigenspezifischen Reaktion von Milzzellen zwischen dem systemischen und intravitrealen Behandlungsschema der afferenten Phase lassen den Schluss zu, dass sich der Wirkmechanismus von Etanercept in Abhängigkeit von der Applikationsroute unterscheidet. Die systemische Etanercept-Applikation bewirkte eher eine Immunsuppression, während die Daten zur intravitrealen Etanercept-Applikation eher für eine immunmodulatorische Wirkung sprechen.

Schlussendlich zeigten die Daten der hier vorliegenden Arbeit einen stärkeren Effekt der systemischen Behandlung mit Etanercept auf die Reduktion des EAU-Schweregrades auf als durch die intravitreale Behandlung mit Etanercept. In einer klinischen Studie wurden bei Patienten mit einer aktiven Uveitis im Vergleich zu Kontroll-Patienten erhöhte Spiegel von TNF- α sowohl im Serum als auch im Vorderkammerwasser detektiert. Ein Vergleich der TNF- α -Spiegel zwischen Vorderkammerwasser und Serum resultierte in höheren TNF- α -Konzentrationen im Serum. Daraus folgerten die Autoren eine stärkere systemische als lokale Beteiligung von TNF- α an der Pathogenese einer Uveitis (Santos Lacombe et al. 2001). Zudem wird ein positiver Behandlungserfolg in weiteren klinischen Studien zur intravitrealen Anwendung anderer TNF- α -Inhibitoren wie Infliximab und Adalimumab bei Uveitis-Patienten kontrovers diskutiert. Während intravitreale Injektionen von Infliximab bei Patienten mit einer chronischen, nicht infektiösen Uveitis und einem damit assoziierten zentralen Makulaödem sowie eines Rückgang des Sehvermögens die Sehschärfe zu verbessern und die Makula-Dicke zu verringern schien, hatte in einer anderen Studie die intravitreale Injektion von Adalimumab keine Wirksamkeit bei der Behandlung von Patienten mit Uveitis-assoziiertem Makulaödem (Farvardin et al. 2010; Androudi et al. 2010). Dies schafft den Eindruck von einem limitierten klinischen Nutzen der intravitrealen Anti-TNF- α -Therapie bei Uveitis. Unter bestimmten Umständen, wie möglicherweise im Auge, hat TNF- α nicht ausschließlich proinflammatorische, sondern auch regulierende und inhibierende Effekte. Wie die entzündungsfördernden Effekte auf der einen Seite, könnten durch eine

intraokulare Anwendung von TNF- α -Inhibitoren auch die regulatorischen Funktionen von TNF- α auf der anderen Seite beeinträchtigt werden. Diese potentiellen Einschränkungen der regulatorischen Funktionen von TNF- α , was einen limitierten Behandlungserfolg der intraokularen TNF- α -Blockade begründen könnte, werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.5 Regulatorische Funktionen von TNF- α im Auge

Neben der Eigenschaft von TNF- α als T-Zell-aktivierender Faktor (Tartaglia et al. 1991) wurde gezeigt, dass myeloide Zellen, die in die Retina einwandern, auch die Proliferation von T-Zellen über einen TNF-R1-abhängigen Signalweg im Auge herunterregulieren können. In TNF-R1-defizienten (TNF-R1^{-/-}) Mäusen war diese Regulation der T-Zell-Proliferation beeinträchtigt (Raveney et al. 2009). Aus diesem Blickwinkel kann spekuliert werden, dass die intraokulare Blockade von TNF- α durch Etanercept möglicherweise den Ablauf von Entzündungsprozessen im Auge limitiert, indem die autokrine Signalgebung durch TNF- α von einwandernden myeloiden Zellen gehemmt wird. Dieser Effekt könnte jedoch dadurch kompensiert werden, dass auch die TNF- α -abhängigen suppressiven Funktionen der myeloiden Zellen auf die T-Zell-Proliferation beeinträchtigt werden. Die Daten zur intravitrealen Injektion von Etanercept der hier vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass die intraokulare Blockade von TNF- α in der efferenten Phase des Modells, wenn bereits Entzündungszellen in das Auge einwandern, unzureichend ist, um den Ablauf von Entzündungsprozessen im Auge zu beeinflussen.

Ein wichtiger Mechanismus oder Beitrag zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des Auges stellt die Induktion von Apoptose durch Zelltod auslösende Moleküle wie Fas-Ligand oder TNF-verwandter Apoptose induzierender Ligand (TRAIL; engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand) bei in das Auge einwandernden Entzündungszellen dar (Ferguson & Griffith 2007; Griffith et al. 1995). Es wurde beschrieben, dass TNF- α Fas-induzierte Apoptose begünstigen kann (Elzey et al. 2001) und darüber hinaus auch den apoptotischen Zelltod von T-Zellen über einen Fas unabhängigen Mechanismus auslösen kann (Sarin et al. 1995). Das spricht dafür, dass TNF- α durch die Induktion von Apoptose von in das Auge einwandernden T-Zellen zum Immunprivileg des Auges beiträgt (Sartani et al. 1996), was durch die intraokulare TNF- α -Blockade mit Etanercept beeinträchtigt werden könnte.

Ein weiterer Mechanismus, durch den TNF- α zum Immunprivileg des Auges beiträgt, ist die Beteiligung von TNF- α an der Induktion von ACAID. Wenn simultan mit dem ACAID-induzierenden Antigen TNF- α -neutralisierende Antikörper in die Vorderkammer des Auges injiziert wurden, war die Suppression der DTH als Maß für die ACAID-Induktion blockiert, woraus gefolgert wurde, dass die intraokulare Produktion von TNF- α eine entscheidende

Komponente der ACAID-Antwort ist (Ferguson et al. 1994). Die Induktion von ACAID durch die Injektion von IRBP in die Vorderkammer unterdrückte die Entwicklung einer EAU in Mäusen, was einen Einfluss von ACAID bei der Aufrechterhaltung der Integrität okulärer Gewebe nahelegt (Hara et al. 1992). Bei einer bereits bestehenden EAU war das Immunprivileg hingegen beeinträchtigt, was von der Unfähigkeit entzündeter Augen abgeleitet wurde, die Induktion von ACAID zu unterstützen (Ohta et al. 1999). In einer anderen Studie wurde die antigenspezifische DTH-Reaktion auch durch die Injektion von Antigen in den Glaskörperraum signifikant reduziert. Dieses Phänomen wurde analog als VCAID bezeichnet (Sonoda et al. 2005). In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die intravitreale Injektion von Etanercept einen Einfluss auf die VCAID-Induktion hat. Im Vergleich zu Mäusen, denen OVA in den Glaskörper injiziert wurde, war die DTH-Reaktion von Mäusen, denen OVA simultan mit Etanercept intravitreal injiziert wurde, erhöht. Die Unterschiede in der DTH zwischen den Behandlungsgruppen wurden durch den Trend in den Ergebnissen zur OVA-spezifischen Produktion von IL-10 durch Zellen aus der Milz untermauert. Im Gegensatz zur DTH war der Gehalt von IL-10 in Zellkulturüberständen antigenspezifisch stimulierter Milzzellen bei der Etanercept/OVA-Gruppe leicht reduziert im Vergleich zur OVA-Gruppe. IL-10 wurde als ein bedeutendes Zytokin bei einer ACAID-Antwort beschrieben. Ortständige antigenpräsentierende Zellen, die in das Auge eingebrachte Antigene aufnehmen und maßgeblich an der Auslösung von ACAID beteiligt sind, produzieren unter dem Einfluss von TGF- β überwiegend IL-10. APZ, die *in vitro* mit TGF- β und mit gegen IL-10 gerichteten Antikörpern inkubiert wurden, verloren ihre Fähigkeit, ACAID zu induzieren (Wilbanks & Streilein 1991; D’Orazio & Niederkorn 1998). Zudem wurde gezeigt, dass von NK-T-Zellen stammendes IL-10 entscheidend für die Differenzierung von antigenspezifischen, ACAID-vermittelnden regulatorischen T-Zellen ist (Sonoda et al. 2001). Demnach ist TNF- α an der Regulation wichtiger Funktionen des okulären Immunprivilegs beteiligt, die durch die intravitreale Anwendung von Etanercept möglicherweise beeinträchtigt werden.

4.6 Die lokale Applikation von ASON bei EAU

Wirkstoffe in Form von Antikörpern gegen TNF- α oder TNF-Inhibitoren in Form eines Fusionsproteins von einem TNF-R mit dem Fc-Fragment eines Antikörpers treten mit dem Zielmolekül TNF- α in seiner löslichen und membrangebundenen Form in Wechselwirkung. Somit wirken solche TNF-Inhibitoren, wozu auch Etanercept zählt, über einen kompetitiven Mechanismus, indem sie mit den natürlich vorkommenden TNF-Rezeptoren um die Bindung von TNF- α konkurrieren. ASON binden an die mRNA des Zielmoleküls und wirken damit

bereits auf der Ebene der Proteintranslation, sodass die Synthese des Zielmoleküls blockiert wird. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit die lokale Applikation von ASON gegen die mRNA von TNF- α eine effektive Alternative bei der Behandlung von EAU darstellt. Wie bei der subkonjunktivalen Applikation von Etanercept auch konnte durch die sunkonjunktivale Injektion von ASON keine Verbesserung des EAU-Schweregrades beobachtet werden. Dies war auch bei einer nur schwach ausgelösten EAU mit milder Ausprägung der Fall. Während durch die intravitreale Injektion von Etanercept in der afferenten Phase des Modells der EAU-Schweregrad reduziert werden konnte, hatten ASON auch bei Anwendung dieses Behandlungsschemas keinen Einfluss auf die EAU. Es wurden allerdings auch keine Anzeichen für eine Verstärkung der Entzündungszeichen durch die intravitreale Injektion von ASON beobachtet. In einer Studie zur Pharmakokinetik intravitreal applizierter, phosphorothioierter ASON in Affen wurden hingegen leichte Entzündungsinfiltrate in okularen Geweben beschrieben. Desweiteren wurde in dieser Studie ein Metabolismus der phosphorothioierten ASON im Vitreus und in der Retina gezeigt (Leeds et al. 1998). Bei Affen und Kaninchen durch intravitreale Injektion applizierte, phosphorothioierte ASON hatten eine Halbwertszeit von nur wenigen Tagen, was sowohl für den Glaskörper als auch für die Retina galt (Leeds et al. 1997; Leeds et al. 1998). Etanercept hingegen zeigte nach der intravitrealen Injektion in Kaninchen, auch bei hohen Dosen (100 μ g), keine toxischen oder entzündungsfördernden Effekte. Sogar mehrere Wochen nach der intravitrealen Injektion waren noch hohe Konzentrationen von intaktem Etanercept in der Retina und in der Choroidea zu detektieren (Fauser et al. 2004). Das spricht dafür, dass Etanercept nach der intravitrealen Injektion über längere Zeiträume wirksam ist als Anti-TNF- α -ASON, was die unterschiedliche Effektivität von Etanercept und ASON bei der intravitrealen Behandlung der EAU in der afferenten Phase erklären könnte. In einer Studie zur lokalen Behandlung einer herpetischen stromalen Keratitis (HSK), einem Tiermodell für eine infektiöse, virale Augenerkrankung, stellte sich die intrakorneale Gabe von Anti-TNF- α -ASON hingegen als effizient für die Verbesserung der HSK heraus (Wasmuth et al. 2003). Zudem zeigten *in vitro* Experimente, dass die dabei eingesetzte ASON-Sequenz, die auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde, die antigen- oder mitogenspezifische TNF- α -Sekretion von Lymphknotenzellen oder Zellen aus der Milz effektiv reduziert (Wasmuth et al. 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch anhand von Zelllysaten nur ein leichter reduzierender Effekt der ASON auf die TNF- α -Expression von LPS- und IFN- γ -stimulierten Knochenmarksmakrophagen festgestellt. Eine verringerte TNF- α -Expression konnte auch nach der Inkubation der Knochenmarksmakrophagen mit KON beobachtet

werden, sodass Sequenz-unabhängige Effekte der Oligonukleotide *in vitro* nicht ausgeschlossen werden konnten.

In der Untersuchung zur Aufnahme und Verteilung von FITC-markierten KON der hier vorliegenden Arbeit konnte auch 5 Tage nach der intravitrealen Injektion noch ein positives FITC-Signal in der Iris, im Ziliarkörper und in der Retina beobachtet werden. Allerdings gaben diese Analysen keinen Aufschluss darüber, ob die ASON noch in ihrer ursprünglichen Form, mit der sie an die mRNA von TNF- α binden können, oder bereits degradiert vorlagen. Die simultane Immunfluoreszenzfärbung von GFAP zeigte eine Kolokalisation der FITC-markierten KON mit GFAP-positiven Zellen der Retina, was eine Aufnahme von ASON durch Glia-Zellen der Retina nahelegt. Demnach ist es fraglich, inwieweit die ASON noch zur Blockade von durch infiltrierende Effektorzellen produziertes TNF- α zur Verfügung stehen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Blockade von TNF- α , was durch ortständige Zellen des Auges wie Glia-Zellen produziert wird (De Kozak et al. 1997; Rao et al. 2003), nicht ausreichend ist, um den EAU-Verlauf zu verbessern.

4.7 Schlussfolgerung

Zusammengefasst war die Behandlung der EAU mit Etanercept in der afferenten Phase effektiver als in der efferenten Phase, wenn bereits antigenspezifische, uveitogene Effektorzellen generiert worden waren. Das lässt darauf schließen, dass TNF- α vorherrschend eine wichtige Rolle in der Induktionsphase der EAU spielt und Etanercept Einfluss auf die Generierung und Aktivierung von uveitogenen Effektorzellen nimmt. Die Daten der hier vorliegenden Arbeit implizieren, dass sich die Wirkmechanismen bei der Verbesserung des EAU-Verlaufs von systemischer und intravitrealer Etanercept-Behandlung unterscheiden. Die systemische Etanercept-Gabe in der afferenten Phase hatte eher eine immunsuppressive Wirkung, während bei der intravitrealen Gabe in dieser Phase eher eine immunmodulatorische Wirkung beobachtet werden konnte.

Bei der Blockade eines einzelnen Faktors ist es allerdings denkbar, dass der Effekt durch die Funktionen anderer Faktoren maskiert oder kompensiert werden kann. Obwohl verschiedene Studien einen Anstieg des zentralen Th1-Zytokins IFN- γ in den okulären Geweben und einen verstärkenden, proinflammatorischen Effekt von lokal produziertem IFN- γ bei EAU mit einem Einfluss auf die Produktion von schädlichen Stickoxidverbindungen aufzeigen (Charteris & Lightman 1992; Geiger et al. 1994; Hoey et al. 1997; Egwuagu et al. 1999), konnte eine EAU bei Mäusen paradoxerweise durch die systemische Blockade von IFN- γ verstärkt und durch die systemische Gabe von rekombinantem IFN- γ reduziert werden (Caspri et al. 1994). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch eine nicht durch Th1

gegenregulierte Th2-Effektorantwort in IFN- γ -defizienten Mäusen eine Uveitis auslösen kann. Diese EAU wurde durch eine von der Th1-Antwort abweichenden Effektorantwort vermittelt, die an ein Th2-Profil erinnernd durch ein von IL-5, IL-6 und IL-10 dominiertes Zytokinprofil, eine veränderte zelluläre Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrats und allergische Elemente der Immunantwort gekennzeichnet war. Allerdings fehlten auch Th2-typische Elemente, wie eine verstärkte antigen-spezifische Produktion von IL-4 (Jones et al. 1997). Somit ist eine Einteilung in „Gut“ und „Böse“ mit Th1 als pathogenen und Th2 als regulierenden, protektiven Zellen bei einer EAU sicherlich nicht ausreichend differenziert. Vielmehr kann durch das Ausschalten einer bestimmten pathogenen Immunreaktion eine Immunreaktion veränderten Typs mit ebenso pathogenen Auswirkungen einspringen (Caspi 2002). Das spricht für die Bedeutung einer Balance und einer Vernetzung zwischen den verschiedenen Subtypen und ihren spezifischen Mediatoren.

Schlussendlich ist auch TNF- α ein sehr vielseitiges und pluripotentes Zytokin, das besonders im Auge Teil eines ausbalancierten Netzwerkes verschiedener Faktoren ist und neben proinflammatorischen Eigenschaften auch regulatorische Funktionen hat. Daher kann gerade die intravitreale Inhibition eines solchen Faktors trotz des reduzierten EAU-Schweregrades in der hier vorliegenden Arbeit durch Etanercept als kritisch betrachtet werden.

Es wären weitere Experimente erforderlich, um zu untersuchen, ob die Kombination dieser Wirkmechanismen durch die gleichzeitige Anwendung einer systemischen und intravitrealen Etanercept-Applikation effektiver in der Reduktion des EAU-Schweregrades ist. Möglicherweise kann durch diese Vorgehensweise ein effektiver Behandlungsansatz erreicht werden, der eine Reduktion der systemischen Etanercept-Dosis erlaubt. Dies wäre unter Berücksichtigung der unerwünschten Nebenwirkungen, die mit einer systemischen TNF- α -Inhibition verbunden sein können (siehe Abschnitt 1.8), erstrebenswert.

4.8 Ausblick

Der Trend zu einer erhöhten DTH-Reaktion und einer verringerten antigenspezifischen Produktion von IL-10 durch Milzzellen nach gleichzeitiger intravitrealer Injektion von Etanercept und OVA legen nahe, dass die intravitreale Applikation von Etanercept möglicherweise einen Einfluss auf die Induktion von VCAID und damit auf das Immunprivileg des Auges hat (Abschnitt 1.3. und 3.8). Zur Bekräftigung dieser Hypothese könnten die zugrundeliegenden Daten in weiterführenden Experimenten durch eine intrazelluläre Färbung von FoxP3 (engl.: forkhead-box-protein P3) bei CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in Einzelzellsuspensionen der Milz untermauert werden. In diesem Zusammenhang könnte der für regulatorische T-Zellen spezifische Transkriptionsfaktor FoxP3 (Fontenot et al. 2003;

Hori et al. 2003) die Induktion dieser Zellen in der Milz im Zuge der VCAID-Immunantwort signalisieren. Bei Untersuchungen zur Auslösung des ACAID-Phänomens durch die Injektion löslicher Proteine in die Vorderkammer des Auges konnte gezeigt werden, dass die Dicke der Injektionskanüle einen Einfluss auf die ACAID-Induktion hat (Ferguson et al. 1994). Demnach war ein mechanischer Reiz in die ACAID-Induktion involviert. Das spricht dafür, dass mechanische Reize oder Traumatisierungen des Auges, wie sie mit intravitrealen Wirkstoffapplikationen verbunden sein können, einen Einfluss auf immunologische Prozesse haben. Auch die Daten der hier vorliegenden Arbeit signalisieren einen Einfluss von intravitrealen Injektionen auf den Zytokingehalt in den okulären Geweben (Abschnitt 3.5.1). Bei der Entwicklung von spezifischen Behandlungsmethoden stellt es sich unter der Berücksichtigung der komplexen Netzwerke verschiedener miteinander interagierender Faktoren als zielführend dar, solche Einflüsse, die mit der intraokularen Applikationstechnik zusammenhängen, gering zu halten. Um mit intraokulären Applikationen verbundene Risiken (Jager et al. 2004) und eine Beeinträchtigung der Integrität des Auges zu minimieren, sollte die Anzahl invasiver Eingriffe, wie bei wiederholten intravitrealen Injektionen, reduziert werden. Ziel der gegenwärtigen Forschung ist es, intraokulare Implantate in Form von sowohl abbaubaren als auch nicht abbaubaren Gelen bzw. Polymeren oder kleinen Containern sowie Trägersubstanzen in Form von kolloidalen Nanopartikeln oder Liposomen zu entwickeln, die in das Auge eingebracht werden können, um dort den eingeschlossenen Wirkstoff über längere Zeiträume kontinuierlich freizusetzen (Kang Derwent & Mieler 2008; Kearns & Williams 2009; Gaudana et al. 2010; Kompella et al. 2010). Die Untersuchung solcher Systeme zur andauernden Wirkstofffreisetzung und deren Effekt auf den EAU-Verlauf wären auch im Zusammenhang mit TNF- α -Inhibitoren wie Etanercept oder Anti-TNF- α -ASON interessant. Bei einem Transfektionsmodell, das die intraokulare Produktion eines TNF- α -Antagonisten über einen Zeitraum von mehreren Wochen gewährleistete, konnte eine signifikante Effektivität in der Reduktion des EAU-Schweregrades festgestellt werden (Kowalczyk et al. 2009).

TNF- α ist ein pluripotentes Zytokin, was gerade im Auge vielseitige Funktionen hat und Teil eines komplexen Netzwerkes ist. Es wäre denkbar, dass die intraokulare Blockade von TNF- α durch die Funktion anderer Faktoren maskiert oder überlagert wird. Das Ziel der Entwicklung von lokalen Behandlungsstrategien bei Uveitis zur Vermeidung von systemischen Nebenwirkungen bleibt von aktueller Bedeutung, sodass in diesem Zusammenhang die Untersuchung weiterer Zielmoleküle von Interesse ist. Es wurde eine entscheidende pathogene Rolle von Th17-Zellen bei der Induktion von autoimmunen Entzündungsmodellen

wie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) oder der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) gezeigt (Murphy et al. 2003; Langrish et al. 2005). Die erhöhte Expression von IL-17 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit aktiver Skleritis und Uveitis weist auf die Bedeutung von Th17-Zellen auch bei pathologischen, okulären Entzündungsprozessen hin (Amadi-Obi et al. 2007). Es bestehen Anzeichen dafür, dass die uveitogenen T-Zell-Subtypen (Th1 und Th17) zu verschiedenen Phasen der EAU eine unterschiedlich starke Beteiligung an den immunpathologischen Prozessen haben. In der frühen Phase der EAU wurde zunächst ein Anstieg von Th17/IL-17 in den Lymphknoten und in den okulären Geweben detektiert. Zu einem späteren Zeitpunkt dominierte ein Th1-geprägtes Effektorprofil (Amadi-Obi et al. 2007; Kaufmann et al. 2011). TNF- α ist an der Regulation der IL-6-Expression beteiligt (Smith et al. 1998) und IL-6 ist in Kombination mit TGF- β ein entscheidender Differenzierungs- und Expansionsfaktor für Th17-Zellen (Bettelli et al. 2006), was die Ergebnisse der wirksamen TNF- α -Inhibition durch Etanercept in der afferenten Phase bei der hier vorliegenden Arbeit unterstützt. Auch das direkte Ausschalten der IL-6-Aktivität durch die systemische Applikation von Anti-IL-6-Antikörpern zeigte nur in der afferenten Phase des EAU-Modells einen verringernden Effekt (Yoshimura et al. 2009). Als Wirkmechanismus der IL-6-Blockade wurde besonders der hemmende Einfluss auf die Differenzierung von Th17-Zellen in Betracht gezogen. Es wurde angenommen, dass Th17-Zellen durch die Induktion von TNF- α in retinalen Zellen zur Pathogenese einer EAU beitragen. Durch die systemische Behandlung immunisierter Mäuse mit IL-17-spezifischen Antikörpern konnte ein verminderter EAU-Schweregrad erreicht werden (Amadi-Obi et al. 2007). Damit stellt IL-17 auch ein interessantes Zielmolekül für eine intraokulare Inhibition dar. Weitere Experimente könnten Aufschluss darüber geben, inwieweit die intraokulare Blockade von IL-17 in der frühen Phase die Entwicklung einer EAU hemmen kann und eine effektive lokale Behandlungsalternative darstellt.

Nach neueren Erkenntnissen wird gerade Th17-Zellen die zentrale Schlüsselrolle im EAU-Modell durch aktive Immunisierung mit CFA zugesprochen (Caspi 2010). Ein CFA-unabhängiges Uveitis-Modell, was durch die Injektion von in vitro gereiften und mit uveitogenem Antigen beladenen dendritischen Zellen übertragen wird, war vorwiegend durch eine Th1-geprägte Immunreaktion vermittelt. Obwohl in IFN- γ -KO-Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen die Th17/IL17-Antwort erhöht war, konnte dieses EAU-Modell in den IFN- γ -KO-Mäusen nicht ausgelöst werden (Tang et al. 2007; Luger et al. 2008). IFN- γ als zentrales Zytokin einer Th1-vermittelten Effektorantwort aktiviert in Kombination mit TNF- α Makrophagen. Durch die Kombination von IFN- γ und TNF- α

aktivierte Makrophagen produzieren Gewebe schädigenden Stickoxidverbindungen (Erwig et al. 1998; Mosser 2003). In diesem Zusammenhang könnte überprüft werden, ob die Hemmung von TNF- α einen mildernden Einfluss auf das durch dendritische Zellen ausgelöste EAU-Modell hat. Es ist wahrscheinlich, dass solche EAU induzierenden dendritische Zellen auch im Zuge einer aktiven Immunisierung generiert werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass TNF- α die letztendliche Reifung von dendritischen Zellen stimuliert. Dendritische Zellen sind sehr wichtige APZ und bedeutende Vermittler der adaptiven Immunantwort (Banchereau & Steinman 1998). Das spricht für eine Bedeutung für TNF- α gerade in der afferenten Phase des aktiven Immunisierungsmodells und unterstützt die Ergebnisse des verringerten EAU-Schweregrades durch die Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase.

Der Mechanismus der TNF- α -Induktion in retinalen Zellen durch Th17/IL-17 im Immunisierungsmodell (Amadi-Obi et al. 2007) wirft wiederum ein Licht auf die Bedeutung von ortsständigen Zellen des Auges bei der EAU-Pathogenese. Es konnte gezeigt werden, dass in der frühen Phase einer EAU, noch bevor Makrophagen in das Auge einwandern, aktivierte Mikroglia-Zellen durch die Produktion von TNF- α und reaktive Stickstoffverbindungen zum Pathomechanismus und durch die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen zur Verstärkung einer EAU beitragen (Rao et al. 2003). Die Proliferation und Aktivierung von Mikroglia-Zellen und deren Produktion von reaktiven Stickstoffverbindungen und proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α kann durch Minocyclin gehemmt werden (Tikka & Koistinaho 2001; Pabreja et al. 2011). Minocyclin ist ein semisynthetisches Tetracyclin (Antibiotikum) mit breitgefächerten antiinflammatorischen Eigenschaften, die sich von der antimikrobiellen Wirkung abgrenzen (Golub et al. 1998; Yrjänheikki et al. 1999; Cai et al. 2011). Minocyclin wurde bereits in tierexperimentellen Studien zur Behandlung von Entzündungen des zentralen Nervensystems und bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt (Brundula et al. 2002; Luccarini et al. 2008; Tilley et al. 1995; Greenwald 2011). Im EAU-Modell wurde Minocyclin bislang nicht angewendet. Die Hemmung von Mikroglia-Zellen in der Retina durch die intravitreale Injektion von Minocyclin während der frühen Phase einer EAU könnte weiteren Aufschluss über die Rolle von ortsständigen Zellen des Auges bei der Entstehung von intraokularen Entzündungsprozessen geben. Es wurden weiterhin von den antientzündlichen Effekten unabhängige neuroprotektive Funktionen von Minocyclin beschrieben (Maier et al. 2007). Damit stellt Minocyclin auch im Zusammenhang der Degeneration von Netzhautgewebe im Zuge der EAU einen interessanten Wirkstoff für die intraokulare Anwendung dar.

5. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden experimentellen Arbeit wurde untersucht, inwieweit die lokale Inhibition von TNF- α den Verlauf der EAU als Modell für die humane endogene posteriore Uveitis verbessern kann und Einfluss auf zugrunde liegende immunologische Prozesse nimmt. Der durchgeführte TNF- α -Bioassay an L929-Zellen zeigte, dass der dabei eingesetzte humanisierte Wirkstoff Etanercept die biologische Aktivität auch von murinem TNF- α *in vitro* effektiv hemmen kann. Um zu überprüfen, ob Etanercept generell auch einen mildernden Einfluss auf den EAU-Verlauf hat, wurde der Wirkstoff zunächst systemisch angewendet. Dabei zeigte sich, dass der EAU-Schweregrad durch die systemische Behandlung mit Etanercept in der afferenten Phase des Modells signifikant verringert war. Dieser reduzierte EAU-Schweregrad in der Etanercept-Behandlungsgruppe war von einer verringerten antigenspezifischen Proliferation von Milzzellen und einer reduzierten antigenspezifischen Produktion von proinflammatorischen Th1-, Th2- sowie Th17-assoziierten Zytokinen durch Milzzellen begleitet. Die systemische Behandlung mit Etanercept in der efferenten Phase des Modells zeigte hingegen keinen reduzierenden Einfluss auf den EAU-Schweregrad sowie die antigenspezifische Proliferation von Milzzellen. Dies galt auch für die systemische Etanercept-Behandlung in dem EAU-Modell, das durch den adoptiven Transfer von IRBPp161-180-spezifischen und *in vitro* restimulierten Splenozyten induziert wurde. Die Ergebnisse zur systemischen TNF- α -Inhibition durch Etanercept signalisierten damit eine bedeutende Rolle von TNF- α in der Induktionsphase der EAU. Es kann gefolgert werden, dass Etanercept in erster Linie Einfluss auf die Generierung von uveitogenen Effektorzellen nimmt, nicht aber auf bereits aktivierte und differenzierte Effektorzellen wirkt.

Zur lokalen Behandlung der EAU wurden intravitreale oder subkonjunktivale Wirkstoffapplikationen angewendet. Auch nach intravitrealen Injektionen von Etanercept in der afferenten Phase des Modells war der EAU-Schweregrad im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringer. Dabei ging die Reduktion des EAU-Schweregrades jedoch nicht mit einer verringerten antigenpezifischen Proliferation von Milzzellen einher. Bezüglich der antigenspezifischen Produktion von Zytokinen durch Milzzellen wurde nach der intravitrealen Etanercept-Applikation eine Reduktion des zentralen Th1-Zytokins IFN- γ beobachtet, während die Th2-assoziierten Zytokine IL-6 und IL-10 erhöht waren. Diese Ergebnisse sprechen für unterschiedliche Wirkmechanismen von Etanercept in Abhängigkeit der Applikationsroute. Der Wirkmechanismus der systemischen Etanercept-Applikation bestand eher in der allgemeinen Suppression der Generierung proinflammatorischer

Effektorfunktionen, während die Ergebnisse zur intravitrealen Etanercept-Applikation eher einen immunmodulatorischen Wirkmechanismus aufzeigten. Die subkonjunktivale Etanercept-Injektion als weiterer lokaler Behandlungsansatz zeigte keinen verringerten Effekt auf den EAU-Schweregrad. Als Wirkstoffkontrolle zu Etanercept wurden gegen die mRNA von TNF- α gerichtete ASON eingesetzt. Es konnte jedoch kein verbessernder Einfluss auf den EAU-Verlauf nach lokaler Applikation beobachtet werden.

Schlussendlich war die systemische Applikation von Etanercept effektiver zur Behandlung der EAU als die intravitreale Applikation. In diesem Zusammenhang wiesen die Experimente zur VCAID-Induktion in der hier vorliegenden Arbeit auf eine Beeinträchtigung des Immunprivilegs des Auges durch die intraokulare TNF- α -Inhibition mit Etanercept hin. Solche Einflüsse auf regulatorische Funktionen von TNF- α könnten damit einen limitierenden Faktor für den Wert der intravitrealen Etanercept-Applikation als lokalen Behandlungsansatz für eine autoimmune posteriore Uveitis darstellen.

6. Summary

In the present experimental study the extent was determined to which local TNF- α inhibition ameliorates the course of an animal model of human posterior uveitis (experimental autoimmune uveoretinitis [EAU]) and it was investigated how this affects underlying immunopathological processes. In these experiments etanercept functioned as an antagonist to block TNF- α . A TNF- α bioassay with L929 cells showed that etanercept effectively inhibits the biological activity of murine TNF- α *in vitro*. The effect of etanercept on the course of EAU was initially analyzed by treating immunized mice systemically in the afferent phase. Here, EAU scores were significantly lower in the etanercept group, which was also accompanied by decreased antigen-specific proliferation of splenocytes. Furthermore, systemic etanercept treatment in the afferent phase lowered the antigen-specific production of various proinflammatory cytokines by splenocytes. In contrast, systemic etanercept treatment in the efferent phase had no reducing effect on EAU severity, nor did it decrease the antigen-specific proliferation of splenocytes as compared to control mice. This was also observed after systemic etanercept treatment of animals in which EAU was induced by adoptive transfer of uveitogenic splenocytes. These results for the systemic TNF- α inhibition by etanercept indicate that TNF- α has a predominant role in the immunopathologic processes of the induction phase of EAU, suggesting that etanercept affects the generation of uveitogenic effector cells rather than having an effect on already activated and differentiated effector cells. For local treatment, etanercept was injected intravitreally or subconjunctivally. After intravitreal etanercept treatment in the afferent phase, EAU scores were also significantly lower than those in the control group. However, the improved EAU scores were not associated with reduced antigen-specific proliferation of splenocytes. Regarding the antigen-specific cytokine response of splenocytes, the Th1 cytokine IFN- γ was reduced after intravitreal etanercept treatment, while the Th2 associated cytokines IL-6 and IL-10 were elevated. These results indicate that the mechanism of action may be different for systemic and intravitreal etanercept treatment. While systemic TNF- α inhibition using etanercept in the afferent phase suppressed proinflammatory effector functions, the mechanism underlying EAU improvement after intravitreal TNF- α inhibition seemed to be immunomodulation. The subconjunctival injection of etanercept as a further local treatment approach showed no ameliorating effect on the course of EAU at any time in this model. In further experiments, ASON binding to the mRNA of TNF- α were used as a drug control to etanercept. Independently of the applied treatment schedule, local ASON treatment had no ameliorating effect on the course of EAU.

Finally, systemic administration of etanercept more effectively ameliorated EAU than intravitreal administration. In this context, the experiments concerning the induction of VCAID shown here indicate that intraocular TNF- α inhibition using etanercept impairs immune privilege of the eye. Interfering with such regulatory functions of local TNF- α may limit the value of intravitreal etanercept treatment for autoimmune posterior uveitis.

7. Literaturverzeichnis

- Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. 1992a. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 175(2):323-9.
- Aderka D, Engelmann H, Shemer-Avni Y, Hornik V, Galil A, Sarov B, Wallach D. 1992b. Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals. *Lymphokine Cytokine Res* 11(3):157-9.
- Agarwal RK, Caspi RR. 2004. Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods Mol Med* 102:395-419.
- Aggarwal BB. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3(9):745-56.
- Akhtar S, Juliano RL. 1992. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Trends Cell Biol* 2(5):139-44.
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4(7):499-511.
- Allen S, Turner SJ, Bourges D, Gleeson PA, van Driel IR. 2011. Shaping the T-cell repertoire in the periphery. *Immunol Cell Biol* 89(1):60-9.
- Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, Gery I, Lee YS, Egwuagu CE. 2007. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13(6):711-8.
- Androudi S, Tsironi E, Kalogeropoulos C, Theodoridou A, Brazitikos P. 2010. Intravitreal adalimumab for refractory uveitis-related macular edema. *Ophthalmology* 117(8):1612-6.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. 2001. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4(11):1116-22.
- Arnold B, Schonrich G, Hammerling GJ. 1993. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today* 14(1):12-4.
- Ashkenazi A, Marsters SA, Capon DJ, Chamow SM, Figari IS, Pennica D, Goeddel DV, Palladino MA, Smith DH. 1991. Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10535-9.
- Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Van Kaer L, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S. 1994. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76(4):651-63.
- Avichezer D, Silver PB, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. 2000. Identification of a new epitope of human IRBP that induces autoimmune uveoretinitis in mice of the H-2b haplotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(1):127-31.

- Azad RF, Driver VB, Tanaka K, Crooke RM, Anderson KP. 1993. Antiviral activity of a phosphorothioate oligonucleotide complementary to RNA of the human cytomegalovirus major immediate-early region. *Antimicrob Agents Chemother* 37(9):1945-54.
- Babu BM, Rathinam SR. 2010. Intermediate uveitis. *Indian J Ophthalmol* 58(1):21-7.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-52.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73(3):431-45.
- Bauer D, Schmitz A, Van Rooijen N, Steuhl KP, Heiligenhaus A. 2002. Conjunctival macrophage-mediated influence of the local and systemic immune response after corneal herpes simplex virus-1 infection. *Immunology* 107(1):118-28.
- Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Baehler H, Busch M, Steuhl KP, Thanos S, Heiligenhaus A. 2012. Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor-gamma positive alternatively activated macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(2):799-810.
- Baumgartner CK, Malherbe LP. 2011. Antigen-driven T-cell repertoire selection during adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol* 89(1):54-9.
- Bawazeer A, Raffa LH, Nizamuddin SH. 2010. Clinical experience with adalimumab in the treatment of ocular Behcet disease. *Ocul Immunol Inflamm* 18(3):226-32.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441(7090):235-8.
- Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. 1985. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229(4716):869-71.
- Bhattacharjee P, Williams RN, Eakins KE. 1983. An evaluation of ocular inflammation following the injection of bacterial endotoxin into the rat foot pad. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(2):196-202.
- Bianchi ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81(1):1-5.
- Biester S, Deuter C, Michels H, Haefner R, Kuemmerle-Deschner J, Doycheva D, Zierhut M. 2007. Adalimumab in the therapy of uveitis in childhood. *Br J Ophthalmol* 91(3):319-24.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S and others. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-33.

- Blackman M, Kappler J, Marrack P. 1990. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248(4961):1335-41.
- Blam ME, Stein RB, Lichtenstein GR. 2001. Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol* 96(7):1977-97.
- Bloch-Michel E, Nussenblatt RB. 1987. International Uveitis Study Group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease. *Am J Ophthalmol* 103(2):234-5.
- Bloquel C, Bessis N, Boissier MC, Scherman D, Bigey P. 2004. Gene therapy of collagen-induced arthritis by electrotransfer of human tumor necrosis factor-alpha soluble receptor I variants. *Hum Gene Ther* 15(2):189-201.
- Bloquel C, Bejjani R, Bigey P, Bedioui F, Doat M, BenEzra D, Scherman D, Behar-Cohen F. 2006. Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis. *FASEB J* 20(2):389-91.
- Bluestone JA. 1995. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 2(6):555-9.
- Böck P (Herausgeber). 1989. *Romeis – Mikroskopische Technik*. 17., neubearbeitete Auflage. Urban und Schwarzenberg.
- Boffa LC, Morris PL, Carpaneto EM, Louissaint M, Allfrey VG. 1996. Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA-binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence. *J Biol Chem* 271(22):13228-33.
- Boiziau C, Kurfurst R, Cazenave C, Roig V, Thuong NT, Toulme JJ. 1991. Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism. *Nucleic Acids Res* 19(5):1113-9.
- Bottomly K. 1988. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. *Immunol Today* 9(9):268-74.
- Bradley JR. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214(2):149-60.
- Braun J, Baraliakos X, Listing J, Fritz C, Alten R, Burmester G, Krause A, Schewe S, Schneider M, Sorensen H and others. 2008. Persistent clinical efficacy and safety of anti-tumour necrosis factor alpha therapy with infliximab in patients with ankylosing spondylitis over 5 years: evidence for different types of response. *Ann Rheum Dis* 67(3):340-5.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST and others. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285(5428):732-6.

- Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H. 1990. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(8):3127-31.
- Broekhuysse RM, Winkens HJ, Kuhlmann ED. 1986. Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. *Curr Eye Res* 5(3):231-40.
- Broekhuysse RM, Stekhoven JH, Arends M. 1991. Experimental autoimmune retinitis in the rat induced by immunization with rhodopsin: an ultrastructural study. *Exp Eye Res* 53(2):141-9.
- Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ. 1992. Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). II. Dose-dependent induction and adoptive transfer using a melanin-bound antigen of the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 55(3):401-11.
- Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ. 1993. Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). III. Induction by immunization with purified uveal and skin melanins. *Exp Eye Res* 56(5):575-83.
- Brown DA, Kang SH, Gryaznov SM, DeDionisio L, Heidenreich O, Sullivan S, Xu X, Nerenberg MI. 1994. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J Biol Chem* 269(43):26801-5.
- Brown SL, Greene MH, Gershon SK, Edwards ET, Braun MM. 2002. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum* 46(12):3151-8.
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. 2002. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125(Pt 6):1297-308.
- Cai Z, Zhao Y, Yao S, Bin Zhao B. 2011. Increases in beta-amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF-kappaB pathway activation. *Pharmacol Rep* 63(2):381-91.
- Camelo S, Kezic J, Shanley A, Rigby P, McMenamin PG. 2006. Antigen from the anterior chamber of the eye travels in a soluble form to secondary lymphoid organs via lymphatic and vascular routes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(3):1039-46.
- Caminero A, Comabella M, Montalban X. 2011. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol* 234(1-2):1-6.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(9):3666-70.
- Carvounis PE, Herman DC, Cha S, Burke JP. 2006. Incidence and outcomes of uveitis in juvenile rheumatoid arthritis, a synthesis of the literature. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244(3):281-90.

- Caspi RR. 1992. Immunogenetic aspects of clinical and experimental uveitis. *Reg Immunol* 4(5):321-30.
- Caspi RR. 1999. Immune mechanisms in uveitis. *Springer Semin Immunopathol* 21(2):113-24.
- Caspi RR. 2002. Th1 and Th2 responses in pathogenesis and regulation of experimental autoimmune uveoretinitis. *Int Rev Immunol* 21(2-3):197-208.
- Caspi RR. 2003. Regulation, counter-regulation, and immunotherapy of autoimmune responses to immunologically privileged retinal antigens. *Immunol Res* 27(2-3):149-60.
- Caspi RR. 2006. Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3(1):3-9.
- Caspi RR. 2010. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* 120(9):3073-83.
- Caspi RR, Roberge FG, McAllister CG, el-Saied M, Kuwabara T, Gery I, Hanna E, Nussenblatt RB. 1986. T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol* 136(3):928-33.
- Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, Lando Z, Nussenblatt RB. 1988. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 140(5):1490-5.
- Caspi RR, Chan CC, Leake WC, Higuchi M, Wiggert B, Chader GJ. 1990a. Experimental autoimmune uveoretinitis in mice. Induction by a single eliciting event and dependence on quantitative parameters of immunization. *J Autoimmun* 3(3):237-46.
- Caspi RR, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ. 1990b. The mouse as a model of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Curr Eye Res* 9 Suppl:169-74.
- Caspi RR, Grubbs BG, Chan CC, Chader GJ, Wiggert B. 1992. Genetic control of susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the mouse model. Concomitant regulation by MHC and non-MHC genes. *J Immunol* 148(8):2384-9.
- Caspi RR, Chan CC, Fujino Y, Najafian F, Grover S, Hansen CT, Wilder RL. 1993. Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis. *J Neuroimmunol* 47(2):177-88.
- Caspi RR, Chan CC, Grubbs BG, Silver PB, Wiggert B, Parsa CF, Bahmanyar S, Billiau A, Heremans H. 1994. Endogenous systemic IFN-gamma has a protective role against ocular autoimmunity in mice. *J Immunol* 152(2):890-9.
- Caspi RR, Silver PB, Chan CC, Sun B, Agarwal RK, Wells J, Oddo S, Fujino Y, Najafian F, Wilder RL. 1996. Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th1 response. *J Immunol* 157(6):2668-75.

- Castiblanco CP, Adelman RA. 2009. Sympathetic ophthalmia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247(3):289-302.
- Chan CC, Caspi RR, Ni M, Leake WC, Wiggert B, Chader GJ, Nussenblatt RB. 1990. Pathology of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Autoimmun* 3(3):247-55.
- Charteris DG, Lightman SL. 1992. Interferon-gamma (IFN-gamma) production in vivo in experimental autoimmune uveoretinitis. *Immunology* 75(3):463-7.
- Cher DJ, Mosmann TR. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 138(11):3688-94.
- Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 166(5):1229-44.
- Cousins SW, Guss RB, Howes EL, Jr., Rosenbaum JT. 1984. Endotoxin-induced uveitis in the rat: observations on altered vascular permeability, clinical findings, and histology. *Exp Eye Res* 39(5):665-76.
- Crawford A, Macleod M, Schumacher T, Corlett L, Gray D. 2006. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J Immunol* 176(6):3498-506.
- Cresswell P. 1994. Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules. *Curr Biol* 4(6):541-3.
- Cunha-Vaz J. 1979. The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol* 23(5):279-96.
- Curtis JR, Patkar N, Xie A, Martin C, Allison JJ, Saag M, Shatin D, Saag KG. 2007. Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists. *Arthritis Rheum* 56(4):1125-33.
- Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197(9):1141-51.
- D'Orazio TJ, Niederkorn JY. 1998. A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *J Immunol* 160(5):2089-98.
- Davis JC, Jr., Van Der Heijde D, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg DO, Kivitz A, Fleischmann R, Inman R, Tsuji W. 2003. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 48(11):3230-6.
- de Kozak Y, Naud MC, Bellot J, Faure JP, Hicks D. 1994. Differential tumor necrosis factor expression by resident retinal cells from experimental uveitis-susceptible and -resistant rat strains. *J Neuroimmunol* 55(1):1-9.

- de Kozak Y, Cotinet A, Goureau O, Hicks D, Thillaye-Goldenberg B. 1997. Tumor necrosis factor and nitric oxide production by resident retinal glial cells from rats presenting hereditary retinal degeneration. *Ocul Immunol Inflamm* 5(2):85-94.
- Deane JS, Rosenthal AR. 1997. Course and complications of intermediate uveitis. *Acta Ophthalmol Scand* 75(1):82-4.
- Deuter CM, Kotter I, Wallace GR, Murray PI, Stubiger N, Zierhut M. 2008. Behcet's disease: ocular effects and treatment. *Prog Retin Eye Res* 27(1):111-36.
- Dias N, Stein CA. 2002. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1(5):347-55.
- Dick AD, McMenamin PG, Korner H, Scallan BJ, Ghayeb J, Forrester JV, Sedgwick JD. 1996. Inhibition of tumor necrosis factor activity minimizes target organ damage in experimental autoimmune uveoretinitis despite quantitatively normal activated T cell traffic to the retina. *Eur J Immunol* 26(5):1018-25.
- Dick AD, Duncan L, Hale G, Waldmann H, Isaacs J. 1998. Neutralizing TNF-alpha activity modulates T-cell phenotype and function in experimental autoimmune uveoretinitis. *J Autoimmun* 11(3):255-64.
- Dick AD, Forrester JV, Liversidge J, Cope AP. 2004. The role of tumour necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Prog Retin Eye Res* 23(6):617-37.
- Dua HS, Lee RH, Lolley RN, Barrett JA, Abrams M, Forrester JV, Donoso LA. 1992. Induction of experimental autoimmune uveitis by the retinal photoreceptor cell protein, phosducin. *Curr Eye Res* 11 Suppl:107-11.
- Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA. 1994. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5):1863-7.
- Eck MJ, Sprang SR. 1989. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264(29):17595-605.
- Eckstein F. 2000. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10(2):117-21.
- Egwuagu CE, Szein J, Mahdi RM, Li W, Chao-Chan C, Smith JA, Charukamnoetkanok P, Chepelinsky AB. 1999. IFN-gamma increases the severity and accelerates the onset of experimental autoimmune uveitis in transgenic rats. *J Immunol* 162(1):510-7.
- El-Shabrawi Y, Hermann J. 2002. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy with infliximab as an alternative to corticosteroids in the treatment of human leukocyte antigen B27-associated acute anterior uveitis. *Ophthalmology* 109(12):2342-6.

- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghrayeb J and others. 1993. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 36(12):1681-90.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H and others. 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344(8930):1105-10.
- Elzey BD, Griffith TS, Herndon JM, Barreiro R, Tschopp J, Ferguson TA. 2001. Regulation of Fas ligand-induced apoptosis by TNF. *J Immunol* 167(6):3049-56.
- Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem* 264(20):11974-80.
- Engelmann H, Novick D, Wallach D. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* 265(3):1531-6.
- Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ. 1998. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol* 161(4):1983-8.
- Evans TJ, Moyes D, Carpenter A, Martin R, Loetscher H, Lesslauer W, Cohen J. 1994. Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of gram-negative sepsis. *J Exp Med* 180(6):2173-9.
- Fang W, Yang P. 2008. Vogt-koyanagi-harada syndrome. *Curr Eye Res* 33(7):517-23.
- Farvardin M, Afarid M, Mehryar M, Hosseini H. 2010. Intravitreal infliximab for the treatment of sight-threatening chronic noninfectious uveitis. *Retina* 30(9):1530-5.
- Fauser S, Kalbacher H, Alteheld N, Koizumi K, Krohne TU, Joussen AM. 2004. Pharmacokinetics and safety of intravitreally delivered etanercept. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(7):582-6.
- Fearon DT, Locksley RM. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272(5258):50-3.
- Ferguson TA, Herndon JM, Dube P. 1994. The immune response and the eye: a role for TNF alpha in anterior chamber-associated immune deviation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(5):2643-51.
- Ferguson TA, Griffith TS. 2007. The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response. *Chem Immunol Allergy* 92:140-54.
- Fleisher LN, Ferrell JB, McGahan MC. 1990. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor-alpha and endotoxin. *Inflammation* 14(3):325-35.

- Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2(6):561-72.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4):330-6.
- Forrester JV, Liversidge J, Dua HS, Towler H, McMenamin PG. 1990. Comparison of clinical and experimental uveitis. *Curr Eye Res* 9 Suppl:75-84.
- Forrester JV, Liversidge J, Dua HS, Dick A, Harper F, McMenamin PG. 1992. Experimental autoimmune uveoretinitis: a model system for immunointervention: a review. *Curr Eye Res* 11 Suppl:33-40.
- Forrester JV, Huitinga I, Lumsden L, Dijkstra CD. 1998. Marrow-derived activated macrophages are required during the effector phase of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Curr Eye Res* 17(4):426-37.
- Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. 1996. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science* 271(5256):1728-30.
- Fowlkes BJ, Ramsdell F. 1993. T-cell tolerance. *Curr Opin Immunol* 5(6):873-9.
- Fox GM, Kuwabara T, Wiggert B, Redmond TM, Hess HH, Chader GJ, Gery I. 1987. Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): differences between EAU induced by IRBP and by S-antigen. *Clin Immunol Immunopathol* 43(2):256-64.
- Foxman EF, Zhang M, Hurst SD, Muchamuel T, Shen D, Wawrousek EF, Chan CC, Gery I. 2002. Inflammatory mediators in uveitis: differential induction of cytokines and chemokines in Th1- versus Th2-mediated ocular inflammation. *J Immunol* 168(5):2483-92.
- Furrer E, Berdugo M, Stella C, Behar-Cohen F, Gurny R, Feige U, Lichtlen P, Urech DM. 2009. Pharmacokinetics and posterior segment biodistribution of ESBA105, an anti-TNF-alpha single-chain antibody, upon topical administration to the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(2):771-8.
- Gajewski TF, Fitch FW. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140(12):4245-52.
- Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. 2010. Ocular drug delivery. *AAPS J* 12(3):348-60.
- Geborek P, Bladstrom A, Turesson C, Gulfe A, Petersson IF, Saxne T, Olsson H, Jacobsson LT. 2005. Tumour necrosis factor blockers do not increase overall tumour risk in patients with rheumatoid arthritis, but may be associated with an increased risk of lymphomas. *Ann Rheum Dis* 64(5):699-703.

- Geiger K, Howes E, Gallina M, Huang XJ, Travis GH, Sarvetnick N. 1994. Transgenic mice expressing IFN-gamma in the retina develop inflammation of the eye and photoreceptor loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(6):2667-81.
- Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V and others. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67(5-6):222-6.
- Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. 1998. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 12(2):12-26.
- Granger GA, Kolb WP. 1968. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: mechanisms of immune and non-immune small lymphocyte mediated target L cell destruction. *J Immunol* 101(1):111-20.
- Greene HS. 1949. Heterologous transplantation of the Brown-Pearce tumors. *Cancer Res* 9(12):728-35, illust.
- Greenwald RA. 2011. The road forward: the scientific basis for tetracycline treatment of arthritic disorders. *Pharmacol Res* 64(6):610-3.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K and others. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83(5):793-802.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270(5239):1189-92.
- Gritz DC, Montes C, Atalla LR, Wu GS, Sevanian A, Rao NA. 1991. Histochemical localization of superoxide production in experimental autoimmune uveitis. *Curr Eye Res* 10(10):927-31.
- Gritz DC, Wong IG. 2004. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ophthalmology* 111(3):491-500; discussion 500.
- Gryaznov SM, Lloyd DH, Chen JK, Schultz RG, DeDionisio LA, Ratmeyer L, Wilson WD. 1995. Oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(13):5798-802.
- Gupta S. 2002. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol* 22(4):185-94.
- Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR. 1991. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352(6333):342-4.
- Hankey DJ, Lightman SL, Baker D. 2001. Interphotoreceptor retinoid binding protein peptide-induced uveitis in B10.RIII mice: characterization of disease parameters and immunomodulation. *Exp Eye Res* 72(3):341-50.

- Hanvey JC, Peffer NJ, Bisi JE, Thomson SA, Cadilla R, Josey JA, Ricca DJ, Hassman CF, Bonham MA, Au KG and others. 1992. Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* 258(5087):1481-5.
- Hara Y, Caspi RR, Wiggert B, Chan CC, Wilbanks GA, Streilein JW. 1992. Suppression of experimental autoimmune uveitis in mice by induction of anterior chamber-associated immune deviation with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J Immunol* 148(6):1685-92.
- Heeger PS, Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu J, Muqim N, Xu Y, Medof ME. 2005. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med* 201(10):1523-30.
- Heiligenhaus A, Thureau S, Hennig M, Grajewski RS, Wildner G. 2010. Anti-inflammatory treatment of uveitis with biologicals: new treatment options that reflect pathogenetic knowledge of the disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248(11):1531-51.
- Heiligenhaus A, Wefelmeyer D, Wefelmeyer E, Rösel M, Schrenk M. 2011. The eye as a common site for the early clinical manifestation of sarcoidosis. *Ophthalmic Res* 46(1):9-12.
- Hennig M. 2012. Der Einfluss von Everolimus auf den Verlauf der EAU. Buchveröffentlichung der Dissertation. Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften. ISBN- 978-3-8381-1680-8.
- Hoey S, Grabowski PS, Ralston SH, Forrester JV, Liversidge J. 1997. Nitric oxide accelerates the onset and increases the severity of experimental autoimmune uveoretinitis through an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 159(10):5132-42.
- Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76(1):17-27.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057-61.
- Howard M, O'Garra A. 1992. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13(6):198-200.
- Hutchison S, Choo-Kang BS, Bundick RV, Leishman AJ, Brewer JM, McInnes IB, Garside P. 2008. Tumour necrosis factor-alpha blockade suppresses murine allergic airways inflammation. *Clin Exp Immunol* 151(1):114-22.
- Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. 2005. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol* 140(3):509-16.
- Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET, Jr. 2004. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina* 24(5):676-98.
- Jakob E, Max R, Mackensen F. 2009. Okuläre Tuberkulose – Diagnostik und Therapie. *Z. prakt. Augenheilkd.* 30: 509-22.

- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002. Immunologie. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375(6527):151-5.
- Jiang HR, Lumsden L, Forrester JV. 1999. Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10RIII mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(13):3177-85.
- Jiang G, Ke Y, Sun D, Han G, Kaplan HJ, Shao H. 2008. Reactivation of uveitogenic T cells by retinal astrocytes derived from experimental autoimmune uveitis-prone B10RIII mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(1):282-9.
- Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227(1):234-47.
- Jones EY, Stuart DI, Walker NP. 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338(6212):225-8.
- Jones LS, Rizzo LV, Agarwal RK, Tarrant TK, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. 1997. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *J Immunol* 158(12):5997-6005.
- Joseph A, Raj D, Dua HS, Powell PT, Lanyon PC, Powell RJ. 2003. Infliximab in the treatment of refractory posterior uveitis. *Ophthalmology* 110(7):1449-53.
- Kang Derwent JJ, Mieler WF. 2008. Thermoresponsive hydrogels as a new ocular drug delivery platform to the posterior segment of the eye. *Trans Am Ophthalmol Soc* 106:206-13; discussion 213-4.
- Kaplan HJ, Niederkorn JY. 2007. Regional immunity and immune privilege. *Chem Immunol Allergy* 92:11-26.
- Kaufmann U, Diedrichs-Möhring M, Wildner G. 2011. Intraocular T cell responses in monophasic vs. relapsing rat EAU. IOVS; 52: ARVO E-Abstract 2927.
- Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345(15):1098-104.
- Kearns VR, Williams RL. 2009. Drug delivery systems for the eye. *Expert Rev Med Devices* 6(3):277-90.
- Keystone E. 2002. Treatments no longer in development for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2:ii43-5.
- Killar L, MacDonald G, West J, Woods A, Bottomly K. 1987. Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells. *J Immunol* 138(6):1674-9.

- Kilmartin DJ, Dick AD, Forrester JV. 2000. Sympathetic ophthalmia risk following vitrectomy: should we counsel patients? *Br J Ophthalmol* 84(5):448-9.
- Kim SK, Wold BJ. 1985. Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA. *Cell* 42(1):129-38.
- Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P and others. 1993. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 30(16):1443-53.
- Kolb WP, Granger GA. 1968. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61(4):1250-5.
- Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. 1999. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1:I32-9.
- Kompella UB, Kadam RS, Lee VH. 2010. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv* 1(3):435-456.
- Kopp EB, Medzhitov R. 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11(1):13-8.
- Kowalczyk L, Touchard E, Camelo S, Naud MC, Castaneda B, Brunel N, Besson-Lescure B, Thillaye-Goldenberg B, Bigey P, BenEzra D and others. 2009. Local ocular immunomodulation resulting from electrotransfer of plasmid encoding soluble TNF receptors in the ciliary muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(4):1761-8.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374(6522):546-9.
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53(1):45-53.
- Kulka M, Smith CC, Aurelian L, Fischelevich R, Meade K, Miller P, Ts'o PO. 1989. Site specificity of the inhibitory effects of oligo(nucleoside methylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early mRNA 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18):6868-72.
- Kurreck J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270(8):1628-44.
- Kurts C, Sutherland RM, Davey G, Li M, Lew AM, Blanas E, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. 1999. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22):12703-7.
- Labrecque N, Baldwin T, Lesage S. 2011. Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection. *Immunol Cell Biol* 89(1):16-26.

- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201(2):233-40.
- Lee KC, Wong M. 1980. Functional heterogeneity of culture-grown bone marrow-derived macrophages. I. Antigen presenting function. *J Immunol* 125(1):86-95.
- Leeds JM, Henry SP, Truong L, Zutshi A, Levin AA, Kornbrust D. 1997. Pharmacokinetics of a potential human cytomegalovirus therapeutic, a phosphorothioate oligonucleotide, after intravitreal injection in the rabbit. *Drug Metab Dispos* 25(8):921-6.
- Leeds JM, Henry SP, Bistner S, Scherrill S, Williams K, Levin AA. 1998. Pharmacokinetics of an antisense oligonucleotide injected intravitreally in monkeys. *Drug Metab Dispos* 26(7):670-5.
- Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA. 1993. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):11054-8.
- Levin AA. 1999. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1489(1):69-84.
- Lightman S, Kok H. 2002. Developments in the treatment of uveitis. *Expert Opin Investig Drugs* 11(1):59-67.
- Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A. 1982. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol* 73(2):299-310.
- Liversidge J, Dick A, Gordon S. 2002. Nitric oxide mediates apoptosis through formation of peroxynitrite and Fas/Fas-ligand interactions in experimental autoimmune uveitis. *Am J Pathol* 160(3):905-16.
- Loetscher H, Gentz R, Zulauf M, Lustig A, Tabuchi H, Schlaeger EJ, Brockhaus M, Gallati H, Manneberg M, Lesslauer W. 1991. Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity. *J Biol Chem* 266(27):18324-9.
- Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen JS, Neckers LM. 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(10):3474-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.
- Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, Biamonte F, Bellucci A, Rosi MC, Grossi C, Massacesi L, Casamenti F. 2008. Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. *Exp Neurol* 211(1):214-26.

- Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, Bowman EP, Sgambellone NM, Chan CC, Caspi RR. 2008. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 205(4):799-810.
- Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kuhnert AV, Williams SK, Neusch C, Bahr M, Diem R. 2007. Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation. *Neurobiol Dis* 25(3):514-25.
- Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN and others. 1998. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41(9):1552-63.
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177(4):1199-204.
- Männel DN, Echtenacher B. 2000. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 74:141-61.
- Mano T, Tokuda N, Puro DG. 1991. Interferon-gamma induces the expression of major histocompatibility antigens by human retinal glial cells. *Exp Eye Res* 53(5):603-7.
- Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B and others. 1997. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15):8093-8.
- Matsubara T, Pararajasegaram G, Wu GS, Rao NA. 1999. Retinal microglia differentially express phenotypic markers of antigen-presenting cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(13):3186-93.
- Matsuo T, Nakayama T, Koyama T, Koyama M, Fujimoto S, Matsuo N. 1986. Immunological studies of uveitis. 3. Cell-mediated immunity to interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Jpn J Ophthalmol* 30(4):487-94.
- Matzinger P, Guerder S. 1989. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 338(6210):74-6.
- McGreal EP, Miller JL, Gordon S. 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol* 17(1):18-24.
- McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF, Abbas AK. 1994. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J Immunol* 152(5):2172-9.
- McMenamin PG, Crewe J. 1995. Endotoxin-induced uveitis. Kinetics and phenotype of the inflammatory cell infiltrate and the response of the resident tissue macrophages and dendritic cells in the iris and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(10):1949-59.

- McMenamin PG, Forrester JV, Steptoe R, Dua HS. 1993. Ultrastructural pathology of experimental autoimmune uveitis in the rat. *Autoimmunity* 16(2):83-93.
- Mease PJ, Goffe BS, Metz J, VanderStoep A, Finck B, Burge DJ. 2000. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 356(9227):385-90.
- Medawar PB. 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29(1):58-69.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3):295-8.
- Mehrotra PT, Wu D, Crim JA, Mostowski HS, Siegel JP. 1993. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 151(5): 2444-52.
- Mikuls TR, Moreland LW. 2001. TNF blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: infliximab versus etanercept. *Expert Opin Pharmacother* 2(1):75-84.
- Miller JF, Basten A. 1996. Mechanisms of tolerance to self. *Curr Opin Immunol* 8(6):815-21.
- Mo JS, Wang W, Kaplan HJ. 2007. Impact of inflammation on ocular immune privilege. *Chem Immunol Allergy* 92:155-65.
- Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C, Nussenblatt RB, Gery I. 1985. Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(1):1-9.
- Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB. 1993. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151(3):1548-61.
- Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL, Ettlinger RE, Cohen S, Koopman WJ, Mohler K and others. 1997. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 337(3):141-7.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7):2348-57.
- Mosmann TR, Moore KW. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 12(3):A49-53.
- Mosser DM. 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73(2):209-12.

- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198(12):1951-7.
- Murphy CC, Greiner K, Plskova J, Duncan L, Frost A, Isaacs JD, Rebello P, Waldmann H, Hale G, Forrester JV and others. 2004. Neutralizing tumor necrosis factor activity leads to remission in patients with refractory noninfectious posterior uveitis. *Arch Ophthalmol* 122(6):845-51.
- Mushtaq B, Saeed T, Situnayake RD, Murray PI. 2007. Adalimumab for sight-threatening uveitis in Behcet's disease. *Eye (Lond)* 21(6):824-5.
- Myers MJ, Ghildyal N, Schook LB. 1995. Endotoxin and interferon-gamma differentially regulate the transcriptional levels of proto-oncogenes and cytokine genes during the differentiation of colony-stimulating factor type-1-derived macrophages. *Immunology* 85(2):318-24.
- Nair B, Raval G, Mehta P. 2007. TNF-alpha inhibitor etanercept and hematologic malignancies: report of a case and review of the literature. *Am J Hematol* 82(11):1022-4.
- Nakamura S, Yamakawa T, Sugita M, Kijima M, Ishioka M, Tanaka S, Ohno S. 1994. The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(11):3884-9.
- Niederhorn JY. 2007. The induction of anterior chamber-associated immune deviation. *Chem Immunol Allergy* 92:27-35.
- Nussenblatt RB, Mittal KK, Ryan S, Green WR, Maumenee AE. 1982. Birdshot retinochoroidopathy associated with HLA-A29 antigen and immune responsiveness to retinal S-antigen. *Am J Ophthalmol* 94(2):147-58.
- Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1991. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65(2):305-17.
- Ohta K, Wiggert B, Taylor AW, Streilein JW. 1999. Effects of experimental ocular inflammation on ocular immune privilege. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(9):2010-8.
- Okada AA, Sakai J, Usui M, Mizuguchi J. 1998. Intraocular cytokine quantification of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Ocul Immunol Inflamm* 6(2):111-20.
- Okajima TI, Pepperberg DR, Ripps H, Wiggert B, Chader GJ. 1990. Interphotoreceptor retinoid-binding protein promotes rhodopsin regeneration in toad photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17):6907-11.
- Old LJ. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230(4726):630-2.
- Ooi KG, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. 2006. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res* 4(4):294-309.

- Ormerod MG (Herausgeber). 2000. Flow Cytometry – a practical approach. Third Edition. Oxford University Press.
- Pabreja K, Dua K, Sharma S, Padi SS, Kulkarni SK. 2011. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol* 661(1-3):15-21.
- Paul NL, Ruddle NH. 1988. Lymphotoxin. *Annu Rev Immunol* 6:407-38.
- Pearson AM. 1996. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8(1):20-8.
- Pennesi G, Caspi RR. 2002. Genetic control of susceptibility in clinical and experimental uveitis. *Int Rev Immunol* 21(2-3):67-88.
- Pennesi G, Mattapallil MJ, Sun SH, Avichezer D, Silver PB, Karabekian Z, David CS, Hargrave PA, McDowell JH, Smith WC and others. 2003. A humanized model of experimental autoimmune uveitis in HLA class II transgenic mice. *J Clin Invest* 111(8):1171-80.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312(5996):724-9.
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63(2):251-8.
- Pham NL, Badovinac VP, Harty JT. 2011. Differential Role of "Signal 3" Inflammatory Cytokines in Regulating CD8 T Cell Expansion and Differentiation in vivo. *Front Immunol* 2:4.
- Pleyer U, Torun N, Liesenfeld O. 2007. Okuläre Toxoplasmose. *Ophthalmologe* 104(7):603-15, quiz 616.
- Prendergast RA, Iliff CE, Coskuncan NM, Caspi RR, Sartani G, Tarrant TK, Luty GA, McLeod DS. 1998. T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(5):754-62.
- Rahman M. 2006. Introduction to flow cytometry. www.abdserotec.com/recources/literature/brochures. (3.Sep.2011)
- Rambach G, Wurzner R, Speth C. 2008. Complement: an efficient sword of innate immunity. *Contrib Microbiol* 15:78-100.
- Ramsdell F, Fowlkes BJ. 1990. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 248(4961):1342-8.
- Rao NA, Robin J, Hartmann D, Sweeney JA, Marak GE, Jr. 1983. The role of the penetrating wound in the development of sympathetic ophthalmia experimental observations. *Arch Ophthalmol* 101(1):102-4.

- Rao NA, Sevanian A, Fernandez MA, Romero JL, Faure JP, de Kozak Y, Till GO, Marak GE, Jr. 1987. Role of oxygen radicals in experimental allergic uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(5):886-92.
- Rao NA, Kimoto T, Zamir E, Giri R, Wang R, Ito S, Pararajasegaram G, Read RW, Wu GS. 2003. Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1):22-31.
- Raveney BJ, Copland DA, Dick AD, Nicholson LB. 2009. TNFR1-Dependent Regulation of Myeloid Cell Function in Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *J Immunol*.
- Redmond TM, Wiggert B, Robey FA, Nguyen NY, Lewis MS, Lee L, Chader GJ. 1985. Isolation and characterization of monkey interphotoreceptor retinoid-binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina. *Biochemistry* 24(3):787-93.
- Reiff A, Takei S, Sadeghi S, Stout A, Shaham B, Bernstein B, Gallagher K, Stout T. 2001. Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. *Arthritis Rheum* 44(6):1411-5.
- Reiser H, Freeman GJ, Razi-Wolf Z, Gimmi CD, Benacerraf B, Nadler LM. 1992. Murine B7 antigen provides an efficient costimulatory signal for activation of murine T lymphocytes via the T-cell receptor/CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1):271-5.
- Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T. 1995. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154(2):944-53.
- Rizzo LV, Xu H, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. 1998. IL-10 has a protective role in experimental autoimmune uveoretinitis. *Int Immunol* 10(6):807-14.
- Robertson MJ, Erwig LP, Liversidge J, Forrester JV, Rees AJ, Dick AD. 2002. Retinal microenvironment controls resident and infiltrating macrophage function during uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(7):2250-7.
- Robertson M, Liversidge J, Forrester JV, Dick AD. 2003. Neutralizing tumor necrosis factor-alpha activity suppresses activation of infiltrating macrophages in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(7):3034-41.
- Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. 1980. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 286(5773):611-3.
- Rosenbaum JT, Howes EL, Jr., Rubin RM, Samples JR. 1988. Ocular inflammatory effects of intravitreally-injected tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 133(1):47-53.
- Rossol M, Meusch U, Pierer M, Kaltenhauser S, Hantzschel H, Hauschildt S, Wagner U. 2007. Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells. *J Immunol* 179(6):4239-48.

- Rudwaleit M, Rodevand E, Holck P, Vanhoof J, Kron M, Kary S, Kupper H. 2009. Adalimumab effectively reduces the rate of anterior uveitis flares in patients with active ankylosing spondylitis: results of a prospective open-label study. *Ann Rheum Dis* 68(5):696-701.
- Ruiz-Moreno JM, Thillaye B, de Kozak Y. 1992. Retino-choroidal changes in endotoxin-induced uveitis in the rat. *Ophthalmic Res* 24(3):162-8.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133(5):775-87.
- Salfeld J, Kaymakcalan Z, Tracey D, Robert A, Kamen R. 1998. Generation of a fully human anti-TNF antibody D2E7 (abstract). *Arthritis Rheum* 41, Suppl 9: S57.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182(2):389-400.
- Santos Lacomba M, Marcos Martin C, Gallardo Galera JM, Gomez Vidal MA, Collantes Estevez E, Ramirez Chamond R, Omar M. 2001. Aqueous humor and serum tumor necrosis factor-alpha in clinical uveitis. *Ophthalmic Res* 33(5):251-5.
- Saoudi A, Kuhn J, Huygen K, de Kozak Y, Velu T, Goldman M, Druet P, Bellon B. 1993. TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease. *Eur J Immunol* 23(12):3096-103.
- Sarin A, Conan-Cibotti M, Henkart PA. 1995. Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J Immunol* 155(8):3716-8.
- Sartani G, Silver PB, Rizzo LV, Chan CC, Wiggert B, Mastorakos G, Caspi RR. 1996. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy suppresses the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice by inhibiting antigen priming. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(11):2211-8.
- Saurenmann RK, Levin AV, Rose JB, Parker S, Rabinovitch T, Tyrrell PN, Feldman BM, Laxer RM, Schneider R, Silverman ED. 2006. Tumour necrosis factor alpha inhibitors in the treatment of childhood uveitis. *Rheumatology (Oxford)* 45(8):982-9.
- Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. 2002. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 301(2):418-26.
- Schalken JJ, Winkens HJ, van Vugt AH, Bovee-Geurts PH, de Grip WJ, Broekhuysen RM. 1988. Rhodopsin-induced experimental autoimmune uveoretinitis: dose-dependent clinicopathological features. *Exp Eye Res* 47(1):135-45.
- Schlingensiepen R, Brysch W, Schlingensiepen KH (Herausgeber). 1997. Antisense – from technology to therapy. Lab Manual and Textbook. Volume 6. Blackwell Science.
- Schwartz RH. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248(4961):1349-56.

- Scott P. 1991. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 147(9):3149-55.
- Seder RA, Ahmed R. 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 4(9):835-42.
- Selmaj K, Papierz W, Glabinski A, Kohno T. 1995. Prevention of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble tumor necrosis factor receptor I. *J Neuroimmunol* 56(2):135-41.
- Selmaj K, Raine CS, Cross AH. 1991. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol* 30(5):694-700.
- Sen D, Gilbert W. 1992. Novel DNA superstructures formed by telomere-like oligomers. *Biochemistry* 31(1):65-70.
- Sfikakis PP, Theodossiadis PG, Katsiari CG, Kaklamanis P, Markomichelakis NN. 2001. Effect of infliximab on sight-threatening panuveitis in Behcet's disease. *Lancet* 358(9278):295-6.
- Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino MA, Jr. 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol* 135(3):2069-73.
- Shalaby MR, Espevik T, Rice GC, Ammann AJ, Figari IS, Ranges GE, Palladino MA, Jr. 1988. The involvement of human tumor necrosis factors-alpha and -beta in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 141(2):499-503.
- Sharief MK, Hentges R. 1991. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325(7):467-72.
- Sharma A, Thapa B, Lavaju P. 2011. Ocular tuberculosis: an update. *Nepal J Ophthalmol* 3(5):52-67.
- Shear MJ, Perrault A. 1944. Chemical treatment of tumors. IX. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. *J Natl Cancer Inst* 4: 461.
- Shi X, Semkova I, Muther PS, Dell S, Kociok N, Joussen AM. 2006. Inhibition of TNF-alpha reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 83(6):1325-34.
- Shoji Y, Akhtar S, Periasamy A, Herman B, Juliano RL. 1991. Mechanism of cellular uptake of modified oligodeoxynucleotides containing methylphosphonate linkages. *Nucleic Acids Res* 19(20):5543-50.
- Silver PB, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. 1999. The requirement for pertussis to induce EAU is strain-dependent: B10.RIII, but not B10.A mice, develop EAU and Th1 responses to IRBP without pertussis treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(12):2898-905.

- Simon MM, Hochgeschwender U, Brugger U, Landolfo S. 1986. Monoclonal antibodies to interferon-gamma inhibit interleukin 2-dependent induction of growth and maturation in lectin/antigen-reactive cytolytic T lymphocyte precursors. *J Immunol* 136(8):2755-62.
- Smith JR, Hart PH, Williams KA. 1998. Basic pathogenic mechanisms operating in experimental models of acute anterior uveitis. *Immunol Cell Biol* 76(6):497-512.
- Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J. 1999. CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* 190(9):1215-26.
- Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J. 2001. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* 166(1):42-50.
- Sonoda KH, Sakamoto T, Qiao H, Hisatomi T, Oshima T, Tsutsumi-Miyahara C, Exley M, Balk SP, Taniguchi M, Ishibashi T. 2005. The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavity-associated immune deviation. *Immunology* 116(3):390-9.
- Sprent J, Webb SR. 1995. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol* 7(2):196-205.
- Stein CA, Mori K, Loke SL, Subasinghe C, Shinozuka K, Cohen JS, Neckers LM. 1988. Phosphorothioate and normal oligodeoxyribonucleotides with 5'-linked acridine: characterization and preliminary kinetics of cellular uptake. *Gene* 72(1-2):333-41.
- Stein CA. 2001. The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed. *J Clin Invest* 108(5):641-4.
- Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- Streilein JW. 1995. Unraveling immune privilege. *Science* 270(5239):1158-9.
- Streilein JW. 1999. Regional immunity and ocular immune privilege. *Chem Immunol* 73:11-38.
- Streilein JW. 2003. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol* 74(2):179-85.
- Streilein JW, Niederkorn JY. 1981. Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med* 153(5):1058-67.
- Streilein JW, Niederkorn JY. 1985. Characterization of the suppressor cell(s) responsible for anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced in BALB/c mice by P815 cells. *J Immunol* 134(3):1381-7.
- Streilein JW, Niederkorn JY, Shadduck JA. 1980. Systemic immune unresponsiveness induced in adult mice by anterior chamber presentation of minor histocompatibility antigens. *J Exp Med* 152(4):1121-5.

- Sugita S, Takase H, Taguchi C, Mochizuki M. 2007. The role of soluble TNF receptors for TNF-alpha in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(7):3246-52.
- Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Yamada Y, Horie S, Mochizuki M. 2012. Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF-alpha therapy in uveitis patients with Behcet's disease. *Arthritis Res Ther* 14(3):R99.
- Sun B, Sun SH, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. 1999. Autoimmunity to a pathogenic retinal antigen begins as a balanced cytokine response that polarizes towards type 1 in a disease-susceptible and towards type 2 in a disease-resistant genotype. *Int Immunol* 11(8):1307-12.
- Sun B, Sun SH, Chan CC, Caspi RR. 2000. Evaluation of in vivo cytokine expression in EAU-susceptible and resistant rats: a role for IL-10 in resistance? *Exp Eye Res* 70(4):493-502.
- Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145(11):3796-806.
- Tabbara KF. 1990. Ocular toxoplasmosis. *Int Ophthalmol* 14(5-6):349-51.
- Takeuchi M, Yokoi H, Tsukahara R, Sakai J, Usui M. 2001. Differentiation of Th1 and Th2 cells in lymph nodes and spleens of mice during experimental autoimmune uveoretinitis. *Jpn J Ophthalmol* 45(5):463-9.
- Tang P, Hung MC, Klostergaard J. 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35(25):8216-25.
- Tang J, Zhu W, Silver PB, Su SB, Chan CC, Caspi RR. 2007. Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J Immunol* 178(9):5578-87.
- Tanuma N, Kojima T, Shin T, Aikawa Y, Kohji T, Ishihara Y, Matsumoto Y. 1997. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 73(1-2):197-206.
- Tarrant TK, Silver PB, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. 1998. Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 161(1):122-7.
- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Jr., Goeddel DV. 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20):9292-6.
- Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. 1993. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268(25):18542-8.

- Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN. 2000. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(1):38-47.
- Taylor AW. 2007. Ocular immunosuppressive microenvironment. *Chem Immunol Allergy* 92:71-85.
- Taylor SR, Isa H, Joshi L, Lightman S. 2010. New developments in corticosteroid therapy for uveitis. *Ophthalmologica* 224 Suppl 1:46-53.
- Theodossiadis PG, Markomichelakis NN, Sfikakis PP. 2007. Tumor necrosis factor antagonists: preliminary evidence for an emerging approach in the treatment of ocular inflammation. *Retina* 27(4):399-413.
- The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. 1999. TNF neutralization in MS: Results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 53(3): 457-65.
- The Vitravene Study Group. 2002. A randomized controlled clinical trial of intravitreal Fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Am J Ophthalmol* 133(4): 467-74.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M and others. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291(5508):1544-7.
- Thurau SR, Wildner G. 2002. Oral tolerance for treating uveitis - new hope for an old immunological mechanism. *Prog Retin Eye Res* 21(6):577-89.
- Thurau SR, Mempel TR, Flügel A, Diedrichs-Möhling M, Krombach F, Kawakami N, Wildner G. 2004. The fate of autoreactive, GFP+ T cells in rat models of uveitis analyzed by intravital fluorescence microscopy and FACS. *Int Immunol* 16(11):1573-82.
- Tikka TM, Koistinaho JE. 2001. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166(12):7527-33.
- Tilley BC, Alarcon GS, Heyse SP, Trentham DE, Neuner R, Kaplan DA, Clegg DO, Leisen JC, Buckley L, Cooper SM and others. 1995. Minocycline in rheumatoid arthritis. A 48-week, double-blind, placebo-controlled trial. MIRA Trial Group. *Ann Intern Med* 122(2):81-9.
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, 3rd, Zentella A, Albert JD and others. 1986. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234(4775):470-4.
- Tyring S, Gordon KB, Poulin Y, Langley RG, Gottlieb AB, Dunn M, Jahreis A. 2007. Long-term safety and efficacy of 50 mg of etanercept twice weekly in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 143(6):719-26.

- van de Putte LB, Rau R, Breedveld FC, Kalden JR, Malaise MG, van Riel PL, Schattenkirchner M, Emery P, Burmester GR, Zeidler H and others. 2003. Efficacy and safety of the fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody adalimumab (D2E7) in DMARD refractory patients with rheumatoid arthritis: a 12 week, phase II study. *Ann Rheum Dis* 62(12):1168-77.
- van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP, Polman CH. 1996. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47(6):1531-4.
- Vassalli P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411-52.
- Vickers TA, Griffith MC, Ramasamy K, Risen LM, Freier SM. 1995. Inhibition of NF-kappa B specific transcriptional activation by PNA strand invasion. *Nucleic Acids Res* 23(15):3003-8.
- Victor FC, Gottlieb AB. 2002. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol* 1(3):264-75.
- Wacheck V. 2006. [Oligonucleotide therapeutics - an emerging novel class of compounds]. *Wien Med Wochenschr* 156(17-18):481-7.
- Wacker WB, Lipton MM. 1968. Experimental allergic uveitis. I. Production in the guinea pig and rabbit by immunization with retina in adjuvant. *J Immunol* 101(1):151-6.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10(1):45-65.
- Wang Y, Goldschneider I, O'Rourke J, Cone RE. 2001. Blood mononuclear cells induce regulatory NK T thymocytes in anterior chamber-associated immune deviation. *J Leukoc Biol* 69(5):741-6.
- Wasmuth S, Bauer D, Yang Y, Steuhl KP, Heiligenhaus A. 2003. Topical treatment with antisense oligonucleotides targeting tumor necrosis factor-alpha in herpetic stromal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(12):5228-34.
- Webb SR, Sprent J. 1990. Tolerogenicity of thymic epithelium. *Eur J Immunol* 20(11):2525-8.
- Wells AD. 2009. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J Immunol* 182(12): 7331-41.
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24(7):1016-9.
- Wilbanks GA, Streilein JW. 1990. Characterization of suppressor cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced by soluble antigen. Evidence of two functionally and phenotypically distinct T-suppressor cell populations. *Immunology* 71(3):383-9.

- Wilbanks GA, Streilein JW. 1991. Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). 1. Evidence that an antigen-specific, ACAID-inducing, cell-associated signal exists in the peripheral blood. *J Immunol* 146(8):2610-7.
- Wildner G, Diedrichs-Möhring M. 2003. Autoimmune uveitis induced by molecular mimicry of peptides from rotavirus, bovine casein and retinal S-antigen. *Eur J Immunol* 33(9):2577-87
- Wildner G, Diedrichs-Möhring M. 2005. Multiple autoantigen mimotopes of infectious agents induce autoimmune arthritis and uveitis in lewis rats. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(5):677-9.
- Wintersberger U. 1990. Ribonucleases H of retroviral and cellular origin. *Pharmacol Ther* 48(2):259-80.
- Woreta F, Thorne JE, Jabs DA, Kedhar SR, Dunn JP. 2007. Risk factors for ocular complications and poor visual acuity at presentation among patients with uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Am J Ophthalmol* 143(4):647-55.
- Xu H, Manivannan A, Goatman KA, Jiang HR, Liversidge J, Sharp PF, Forrester JV, Crane JJ. 2004. Reduction in shear stress, activation of the endothelium, and leukocyte priming are all required for leukocyte passage across the blood--retina barrier. *J Leukoc Biol* 75(2):224-32.
- Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Rytte AS, Yurchenko LV, Vlassov VV. 1989. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(17):6454-8.
- Yamamoto K, Rose-John S. 2012. Therapeutic blockade of interleukin-6 in chronic inflammatory disease. *Clin Pharmacol Ther* 91(4):574-6.
- Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155(12):5483-6.
- Yocum DE, Esparza L, Dubry S, Benjamin JB, Volz R, Scuderi P. 1989. Characteristics of tumor necrosis factor production in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 122(1):131-45.
- Yokota S, Geppert TD, Lipsky PE. 1988. Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 140(2):531-6.
- Yoshimura T, Sonoda KH, Ohguro N, Ohsugi Y, Ishibashi T, Cua DJ, Kobayashi T, Yoshida H, Yoshimura A. 2009. Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis. *Rheumatology (Oxford)* 48(4):347-54.
- Yrjänheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13496-500.

- Zamecnik PC, Stephenson ML. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1):280-4.
- Zhang J, Wu LY, Wu GS, Rao NA. 1999. Differential expression of nitric oxide synthase in experimental uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(9):1899-905.
- Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* Chapter 14:Unit 14 1.
- Zhou H. 2005. Clinical pharmacokinetics of etanercept: a fully humanized soluble recombinant tumor necrosis factor receptor fusion protein. *J Clin Pharmacol* 45(5):490-7.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-89.

8. Abkürzungsverzeichnis

ACAIID	Vorderkammer-assoziierte Immundeviation (engl. anterior chamber associated immune deviation)
A. dest.	Destilliertes Wasser (lat. Aqua destillata)
AEC	3-Aminoethyl-9-carbazol
AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom (engl. acquired immunodeficiency syndrome)
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (engl. activation induced cell death)
APC	Allophycocyanin
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
APZ	professionelle Antigen-präsentierende Zelle
ASON	Antisense-Oligodesoxyribonukleotide
BD	Morbus Behcet (engl. Behcet's disease)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungsmarker (engl. cluster of differentiation)
CeNA	Cyclohexen-Nukleinsäure (engl. cyclohexen-nucleinacid)
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans (engl. Complete Freund's Adjuvant)
CGRP	Calcitonin-Gen verwandtes Peptid (engl. calcitonin-gene related peptide)
Ci	Curie
CIA	Kollagen induzierte Arthritis (engl. Collagen-induced arthritis)
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Con A	Concanavalin A
cpm	Zähler pro Minute (engl. counts per minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. desoxyribonucleinacid)
DTH	Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (engl. delayed type hypersensitivity reaction)
DTT	1,4-Dithiothreit
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EAU	Experimentelle autoimmune Uveoretinitis
EAAU	Experimentelle akute anteriore Uveitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIU	Endotoxin-induzierte Uveitis
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (engl. enzyme linked immunosorbent assay)
EMA	Europäische Arzneimittelagentur (engl. european agency for the evaluation of medicinal products)
EMIU	Experimentelle Melanin-induzierte Uveitis
et al.	und andere (lat. et alii)
EU	Europäische Union
FADD	Fas-assoziiert via Todesdomäne (engl. Fas-associated via death domain)
FANA	2'-fluoro-arabino Nukleinsäure (engl. 2'-fluoro-arabino necleinacid)
Fc	kristallisierbares Fragment (engl. fragment crystallizable)
FCS	Fötale Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (engl. Food and Drug Administration)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszentes Licht
FoxP3	Engl. forkhead-box-protein P3
FSC	engl. forward scatter

G	Gauge
g	Gramm
GALT	Darmschleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. gut associated lymphoid tissue)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
HE	Hämatoxylin und Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
HSK	Herpetische stromale Keratitis
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein
IRBPp161-180	IRBP-Peptid 161-180
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
JNK	c-Jun N-Terminus Kinase
kDa	Kilodalton
KO	engl. Knockout
KON	Kontrolloligonukleotide
l	Liter
LNA	Geschlossene Nukleinsäure (engl. locked nucleic acid)
LPS	bakterielles Lipopolysaccharid
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl. macrophage colony-stimulating factor)
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MIP-2	engl. macrophage inflammatory protein 2
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
α -MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
N	Stichprobenumfang
NF- κ B	engl. nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-associated molecular patterns)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PBS ^S	PBS mit 1 % FCS
PE	Phycoerythrin

pg	Pikogramm
pH	lat. potentia Hydrogenii
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA	Peptid-Nukleinsäure (engl. peptide nucleic acid)
PRR	Mustererkennungszereptor (engl. pattern recognition receptor)
PTX	Pertussis-Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rheumatische Arthritis
RPE-Zelle	Retinale Pigmentepithelzelle
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RSV	Rous-Sarkom-Virus
S-Antigen	Arrestin (engl. soluble antigen)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SSC	engl. sideways scatter
TACE	TNF- α konvertierendes Enzym (engl. TNF- α converting enzyme)
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (engl. Tris buffered saline)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta (engl. transforming growth factor)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl. Toll like receptor)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF-R	TNF-Rezeptor
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand)
U/ml	Einheiten pro ml (engl. units per ml)
V	Volt
VCAID	Glaskörperraum-assoziierte Immundeiation (engl. vitreous cavity associated immune deviation)
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
x g	Erdbeschleunigung
ZTE	Zentrale tierexperimentelle Einrichtung des Universitätsklinikums Münster

9. Publikationsliste

9.1 Artikel

Busch M, Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Thanos S, and Heiligenhaus A. Effects of systemic and intravitreal tumor necrosis factor- α inhibition in experimental autoimmune uveoretinitis. Zur Publikation eingereicht bei *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

Hennig M, Bauer D, Wasmuth S, Busch M, Walscheid K, Thanos S, and Heiligenhaus A: Everolimus improves experimental autoimmune uveoretinitis by immunosuppression and induction of antigen-specific regulatory T cells. In Vorbereitung.

Dirk Bauer, Maren Hennig, Susanne Wasmuth, Hanna Baehler, Martin Busch, Klaus-Peter Steuhl, Solon Thanos, and Arnd Heiligenhaus: Amniotic Membrane Induces Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Positive Alternatively Activated Macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53 (2): 799-810.

Gabriele Uhl and Martin Busch: Securing paternity: mating plugs in the dwarf spider *Oedothorax retusus* (Araneae: Erigoninae). Biological Journal of the Linnean Society 2009 Mar; 96 (3): 574-583.

9.2 Vorträge

Busch M, Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Thanos S, Heiligenhaus A. Effekt der systemischen oder intravitrealen Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) Inhibition durch Etanercept bei muriner experimenteller Uveoretinitis. Vortrag FR43-267 auf dem 109. DOG-Kongress in Berlin 2011

Hennig M, Wasmuth S, Bauer D, Busch M, Zurek-Imhoff B, Thanos S, Heiligenhaus A. Improvement of uveitis with everolimus is associated with Treg cells. 32th International Congress of Ophthalmology 2010.

Hennig M, Bauer D, Wasmuth S., Busch M, Walscheid K, Heiligenhaus A. Effect of Everolimus on the course of experimental autoimmune uveitis and non-infectious human uveitis. 32. Symposium der Norddeutschen Immunologen 2009.

Hennig M, Bauer D, Wasmuth S, Busch M, Walscheid K, Heiligenhaus A. Der Einfluss von Everolimus auf den Verlauf der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU). Vortrag SO 08.06 auf dem 106. DOG-Kongress in Berlin 2008

9.3 Poster

Hennig M, Bauer D, Busch M, Wasmuth S, Walscheid S, Thanos S, Heiligenhaus A. Prophylactic Everolimus Treatment reduced the Experimental Autoimmune Uveoretinitis in Mice after Adoptive Transfer. ARVO 2012 12-A-5514-ARVO

Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Busch M, Baehler H, Steuhl KP, Thanos S, Heiligenhaus A. Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma positive alternatively activated macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, ARVO Meeting Abstracts 2011; 52: 1128

Busch M, Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Thanos S, Heiligenhaus A. Effect of systemic or intravitreal anti tumor necrosis factor-alpha treatment in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, ARVO Meeting Abstracts 2011; 52: 2277

Hennig M, Bauer D, Busch M, Wasmuth S, Walscheid K, Thanos S, Heiligenhaus A. Effective treatment of experimental autoimmune uveitis with everolimus is associated with the support of regulatory T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* ARVO Meeting Abstracts 2011; 52: 2276

Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Baehler H, Busch M, Steuhl KP, Heiligenhaus A. Amniotic membrane induces PPAR-gamma and arginase 1 positive alternative activated macrophages. 40th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGFI), 22.-25.09.2010, Leipzig, Germany, Poster: MII-115

Hennig M, Bauer D, Wasmuth S, Busch M, Zurek-Imhoff B, Thanos S, Heiligenhaus A. Effective treatment of uveitis with everolimus is associated with the support of regulatory T cells. 40th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGFI), 22.-25.09.2010, Leipzig, Germany, Poster: RTC-119

Busch M, Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Heiligenhaus A. Effect of systemic and local tumor necrosis factor-alpha inhibition in experimental autoimmune uveoretinitis. 40th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGFI), 22.-25.09.2010, Leipzig, Germany, Poster: AI-116

Hennig M, Bauer D, Wasmuth S, Busch M, Walscheid K, Heiligenhaus A. Influence of everolimus on the course of the experimental uveitis (EAU). 2nd European Congress of Immunology (ECI), 13.-16.9.2009, Berlin, Germany, Poster: PC22/10

Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Busch M, Baehler H, Steuhl KP, Heiligenhaus A. Suppression of nonspecific and accessory function of macrophages by amniotic membrane and increased corneal invasion, proliferation and survival in the presence of apoptotic cells. 2nd European Congress of Immunology (ECI), 13.-16.9.2009, Berlin, Germany, Poster: PA07/23

Hennig M, Bauer D, Wasmuth S, Busch M, Walscheid K, Heiligenhaus A. Influence of everolimus on the course of the experimental autoimmune uveitis (EAU). *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, ARVO Meeting Abstracts 2009; 50: 5918

Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Busch M, Baehler H, Steuhl KP, Heiligenhaus A. Phagocytosis of apoptotic or necrotic cells facilitate macrophage survival and proliferation in necrotizing HSV-1 keratitis in the presence of amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, ARVO Meeting Abstracts 2009; 50: 1947

Hennig M, Bauer D, Wasmuth S, Busch M, Walscheid K, Heiligenhaus A. Influence of everolimus on the course of the experimental autoimmune uveitis (EAU). 7th International Symposium on Uveitis, 09.-12.09.2008, Constance, Germany, Poster: P92

Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Busch M, Baehler H, Steuhl KP, Heiligenhaus A. Phagocytosis of apoptotic or necrotic cells facilitate macrophage survival and proliferation in necrotizing HSV-1 keratitis in the presence of amniotic membrane. Annual Meeting of

Immunology of the Austrian and German Societies, (ÖGAI, DGFI), 03.-06.09.2008, Vienna, Austria, Poster: 1947

Busch M, Uhl G. Securing Paternity: Mating Plugs in the Spider *Oedothorax retusus* (Erigoninae: Linyphiidae). 100th Annual Meeting, Deutsche Zoologische Gesellschaft (DZG), 21.-24.9.2007, Cologne, Germany, Poster: EB 20

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Heiligenhaus für die Überlassung des spannenden Themas, die professionelle Betreuung und das Vertrauen in meine Arbeit.

Ich bedanke mich außerdem bei dem gesamten Ophtha-Lab Team, namentlich Dr. Dirk Bauer, Dr. Susanne Wasmuth, Dr. Maren Hennig, Dr. Katharina Lück, Hanna Bähler, Karoline Walscheid, Lena Bagnewski und Ruoxi Wu, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und kollegiale Zusammenarbeit, die vielen wertvollen Anregungen und Hilfestellungen sowie das Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos danke ich für die Möglichkeit, das Labor in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster benutzt haben zu können, und Frau PD Dr. Karin Loser danke ich für die Bereitstellung des Isotopenlabors sowie des Durchflusszytometers.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner lieben Familie und meiner Lebensgefährtin für die fortwährende Unterstützung und Ermutigung und den liebevollen Beistand.

Der **Lebenslauf** ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Der Einfluss der lokalen oder systemischen Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Inhibition auf die Immunantwort im Modell der experimentellen autoimmunen Uveoretinitis*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Martin Busch befürworte.

Essen, den 05. Juni 2012 _____

Prof. Dr. med. A. Heiligenhaus

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 05. Juni 2012 _____

Martin Busch

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 05. Juni 2012 _____

Martin Busch